

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## SUR LA CONSTITUTION ET LA CONSERVATION PAR LA CHLOROPICRINE DU STOCK DE BLÉ DIT " DE SÉCURITÉ "

par GABRIEL BERTRAND.

Il y a deux ans, lors de la discussion parlementaire de la loi (1) tendant à l'assainissement du marché du blé, le Gouvernement s'est engagé à constituer, par l'intermédiaire de l'Intendance militaire, un stock de sécurité d'une importance maxima de 6.000.000 de quintaux.

Cette loi précisait que « les opérations d'achat devraient porter immédiatement pour moitié sur les blés stockés par les coopératives bénéficiaires de contrats de stockage et, pour moitié, être réalisées par des achats d'autres blés faits directement aux producteurs ».

La constitution de ce stock, dont l'ampleur n'avait été jusqu'à ce jour, tout au moins en France, jamais égalée, a mis l'Administration en présence de gros et difficiles problèmes. Grâce à la compétence et à l'esprit de décision de M. l'Intendant général Briolay, ces problèmes ont été, comme on le verra dans la suite, assez heureusement résolus.

|                                       |                            |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Les coopératives ont fourni . . . . . | 2.890.185 quintaux.        |
| Les producteurs . . . . .             | <u>2.625.211 quintaux.</u> |
| Soit au total. . . . .                | 5.515.396 quintaux.        |

(1) Promulguée le 24 décembre 1934.

Le service de l'Intendance savait, par expérience, que les blés français, dont l'humidité est assez élevée, se conservent plus facilement en sacs que d'une autre manière. Il a donc fallu, tout d'abord, ensacher les énormes quantités de grain qui étaient disséminées sur tous les points du territoire, se procurer des sacs et les répartir entre les divers fournisseurs. L'Intendance en a loué environ 1.800.000 et en a fait confectionner près de 4.000.000. Le prix unitaire de ces sacs, en bonne toile de jute, du poids de 750 grammes environ, n'a pas dépassé 3 francs. Les transports de ces sacs, à eux seuls, ont nécessité l'emploi d'environ 2.000 wagons.

Un autre et plus gros problème pour l'Intendance a été de trouver des locaux pour abriter, dans des conditions acceptables, les 6.000.000 environ de quintaux achetés. Force a été de s'adresser à des entreprises de magasinage. On s'est alors trouvé aux prises avec deux préoccupations contradictoires : celle de limiter les surfaces à occuper et celle de ne pas engorger le blé sur une hauteur trop grande, susceptible de nuire à sa conservation.

Réparti en couches de 0 m. 80 d'épaisseur, selon la pratique ordinaire du commerce, il aurait fallu une surface de 100 hectares de planchers, sans compter les espaces nécessaires aux passages. Mis en sacs, disposés en piles de 1.000 quintaux environ, sur 12 rangs de hauteur, le stock n'aurait plus occupé qu'une surface d'environ 50 hectares, ce qui représente encore près de sept fois la surface de la place de la Concorde.

Les emplacements de stockage ont été déterminés, par la force des choses, là où l'on a trouvé de la place à des conditions de prix acceptables. On les a répartis, suivant un plan logiquement établi, dans 60 villes, groupées en 20 régions.

100.000 quintaux ont été transportés des lieux d'achat aux points de stockage par camions, 250.000 quintaux par chalands et 5.165.396 quintaux par chemin de fer dans environ 36.000 wagons.

En général, les blés livrés ont donné toute satisfaction, tant au point de vue de la qualité intrinsèque que du poids. Le grain fourni par les producteurs libres a été particulièrement apprécié, sa densité atteignant 78,80 et même 82 kilogrammes. Les fournitures faites par les coopératives se sont rapprochées



beaucoup plus souvent des conditions minima imposées. Quelques difficultés ont même été rencontrées avec ces dernières dans des régions riveraines de la Manche et de la mer du Nord, ainsi qu'en Bretagne, régions qui produisent, en général, des grains d'une haute teneur en humidité et souvent chargés, surtout dans l'extrême-Ouest, d'une proportion exagérée de graines étrangères.

Le stock comprenait finalement : 5.256.684 quintaux en sacs, 77.940 quintaux en couches et 180.772 quintaux en silos.

Mais l'Intendance n'était pas au bout de ses difficultés. Il restait maintenant à conserver le stock, à le protéger contre les déprédations.

Les principaux ennemis contre lesquels il a fallu lutter ont été l'humidité, les rongeurs et les insectes, en particulier les charançons.

Contre l'humidité, on a dû se contenter de donner aux grains le plus d'aération possible : les sacs ont été mis en piles ne dépassant pas 1.000 quintaux, avec des espaces libres d'environ 1 mètre entre chaque pile, et, pour les blés en vrac, la hauteur des couches a été limitée à 1 mètre.

A l'exception de quelques lots dont le taux d'humidité était inférieur à 13 p. 100, tous les blés en couches et en silos ont manifesté des tendances à l'échauffement, quelle qu'ait été la hauteur des couches, et il a fallu procéder à des pelletages.

Les blés en sacs, même à 16 p. 100 d'humidité, ont parfaitement résisté à l'échauffement. Lorsque le fait s'est produit en quelques points isolés, l'augmentation de température ne s'est pas propagée dans la masse. La toile et la couche d'air entre les sacs ont servi d'isolants.

On a constaté que la température s'élevait dans les sacs de blé d'une teneur en eau inférieure à 14 p. 100 lorsqu'ils étaient atteints gravement par les charançons. Ce fait a sa principale origine, à mon sens, dans les phénomènes de combustion respiratoire des insectes. A Amiens, par exemple, des sacs dont la chaleur était sensible à la main ont repris leur température normale aussitôt après la destruction des charançons.

Contre les rongeurs, les procédés de lutte connus : chats et chiens ratiers, mort-aux-rats, virus Pasteur, ont été employés par les entrepreneurs de magasinage. Les résultats ont été

variables et incertains. Toutefois, les dégâts ne paraissent pas avoir dépassé 5 p. 100 pour la sacherie, et pour les grains les pertes ont été insignifiantes.

Les moineaux ont aussi causé quelques ravages, notamment à Paris où l'on a été obligé de faire grillager certains magasins.

Les pires ennemis à envisager étaient les acariens et les insectes, parmi lesquels l'alcute, la teigne, le *tribolium* et surtout le charançon.

Comme on sait, le mâle et la femelle du charançon (ou calandre) qui ont passé l'hiver dans des recoins, des fentes de murs ou de planchers, s'accouplent dès le mois d'avril. La femelle pénètre ensuite dans les amas de blé et pond un œuf par grain. Quarante-cinq jours s'écoulent entre l'éclosion de cet œuf et le moment où le nouvel insecte sort du grain infesté.

D'après J.-Ch. Herpin, les pontes d'une seule femelle peuvent donner naissance à plus de 60.000 insectes en une saison.

En admettant le poids moyen de 50 milligrammes pour un grain de blé, 60.000 grains attaqués représentent une perte de trois kilogrammes de blé.

Des moyens divers ont été proposés depuis plus ou moins longtemps pour combattre ce redoutable parasite : le pelletage fréquemment renouvelé, le chauffage, l'asphyxie par le gaz carbonique, l'intoxication par le gaz sulfureux, le sulfure ou le tétrachlorure de carbone, l'acide cyanhydrique, la chloropicrine, etc.

Afin de choisir entre ces moyens, d'en étudier l'applicabilité dans les conditions très spéciales devant lesquelles on se trouvait, une Commission a été instituée par arrêté du Ministre de l'Agriculture, en date du 29 avril 1935 ; présidée par M. Brastart, directeur de l'Agriculture, représentant M. le Ministre de l'Agriculture où, en son absence, par M. l'Intendant général Briolay, elle comprenait MM. les professeurs Gabriel Bertrand, Bouvier, Marchal, assistés de MM. Javillier, Lesne et Vaissière, et de M. le Pharmacien général Moreau.

Cette Commission a préconisé l'emploi de la chloropicrine, d'après le procédé, proposé en 1919, par M. Gabriel Bertrand à la Commission des Applications des produits chimiques de



Guerre à l'Agriculture (2). Ce procédé avait déjà fait l'objet de recherches et d'applications nombreuses. C'est ainsi que MM. Gabriel Bertrand, Brocq-Rousseu et Dassonville l'avaient étudié en détail pour la destruction du charançon et du *tribolium* (3). Des essais pratiques avaient suivi. Entre autres, du maïs traité avait servi de nourriture aux chevaux pendant un mois sans répugnance et sans inconvénient ; du blé, également débarrassé des insectes qui commençaient à l'attaquer, avait été transformé, par les soins de l'Intendance militaire, en farine, puis en pain, et cela sans aucune différence perceptible avec le blé non traité.

En outre, des opérations plus importantes de désinsectisation des grains avaient été entreprises en 1921 et en 1922, notamment sous la conduite de M. le Pharmacien militaire Piedallu, à Bordeaux, à Saint-Cyr, à Paris et à Strasbourg, sur un ensemble de 35.000 quintaux de blé charançonné appartenant au Service de l'Intendance. Elles avaient donné toute satisfaction. Enfin, en 1932, M. Shabetaï, actuellement professeur à l'Institut agricole d'Egypte, avait fait connaître les résultats d'une étude importante sur le traitement du blé et de la graine de coton par la chloropicrine, étude d'après laquelle la destruction des insectes peut être assurée sans nuire à la valeur germinative (4).

Les opérations de la désinsectisation du stock de sécurité ont été exécutées par le Service de l'Intendance, avec le concours du Ministère de la Guerre qui a fourni la chloropicrine et le personnel spécialisé dans le maniement des gaz asphyxiants (5).

Ces opérations ont commencé au mois de juin 1935 et ont été poursuivies jusqu'en février 1936. Pendant cette période,

(2) La chloropicrine ou nitrochloroforme appartient au groupe des substances que j'ai proposé, en décembre 1914, d'appeler lacrymogènes, en raison de leur action physiologique spéciale, et qui ont été depuis utilisées pendant la guerre (voir *C. R. Ac. Sc.*, **171**, 1920, p. 965).

(3) *C. R. Ac. Sc.*, **169**, 1919, p. 880, 1059 et 1428.

(4) *C. R. Ac. Agric.*, **19**, 1933, p. 76 à 79, et Thèse Fac. Sciences Univ. Paris, 1932, Jouve et Cie, édit.

(5) Pour assurer la réussite de telles opérations sans inconvénient pour le voisinage ou pour les personnes qui les exécutent, il est nécessaire de recourir à des équipes entraînées au port du masque et au maniement de la chloropicrine.

1.390.243 quintaux de blé ont été traités par la chloropicrine, en 78 opérations effectuées dans 21 centres de stockage. La quantité de chloropicrine employée s'est élevée à 13.108 kilogrammes, soit, en moyenne, à 9 gr. 43 par quintal de blé traité.

Selon les circonstances, on a employé quatre modes de traitement : par magasins entiers, sous bâches, en couches et en silos.

Le traitement sous bâches a été employé lorsqu'une étanchéité suffisante des magasins ne pouvait être obtenue, lorsque les magasins abritaient d'autres denrées que le blé, enfin, dans un but d'économie, quand le volume occupé par le blé restait au-dessous des  $2/3$  du volume total.

Voici quelques détails sur la manière d'opérer (6).

#### A. — TRAITEMENT EN MAGASINS.

Quand le blé est rassemblé en piles de sacs dans des magasins que l'on peut assez facilement rendre étanches aux vapeurs de chloropicrine et que, d'autre part, le grain occupe la totalité ou la presque totalité du magasin, on se trouve dans le cas où le procédé est le plus économique.

On s'efforce d'obtenir avant tout une étanchéité aussi complète que possible du local ; cette étanchéité est une condition indispensable à réaliser.

On commence par repérer toutes les fissures et tous les trous que l'on bouche avec du plâtre, de la terre glaise ou du mastic, ou bien que l'on recouvre de plusieurs couches de papier soigneusement collées. On ferme les portes et les fenêtres et on les calfeutre avec des bandes de papier collées à la colle de pâte.

Lorsque le local à traiter est situé directement sous un toit en tuiles, même voligé, ou sous un toit en ardoises ou en tôles,

(6) Je ne reviendrai pas ici sur les caractères de la chloropicrine, ni sur les précautions qu'il faut prendre pour la manipuler. On pourra consulter à ce sujet : Gab. BERTRAND, *C. R. Ac. Sc.*, **168**, 1919, p. 742 ; Gab. BERTRAND et Mme ROSENBLATT, *Ibid.* p. 911. — Gab. BERTRAND, *Dératisation des navires par la chloropicrine* ; Deuxième conférence intern. et Congrès colonial du Rat et de la Peste, Paris, 7 au 10 octobre 1931, p. 492-499 (Vigot frères, édit. Paris).



il est nécessaire pour éviter les fuites de chloropicrine par le toit, d'établir au-dessus des piles de sacs un faux plafond, constitué par des bâches ou du papier imperméable (fig. 1). Les bâches reliées entre elles par leurs anneaux sont fixées, d'une part aux entrails des fermes, d'autre part à des chevrons cloués aux murs. Les joints entre les bâches, de même que les joints entre les bâches et les murs, sont rendus étanches par

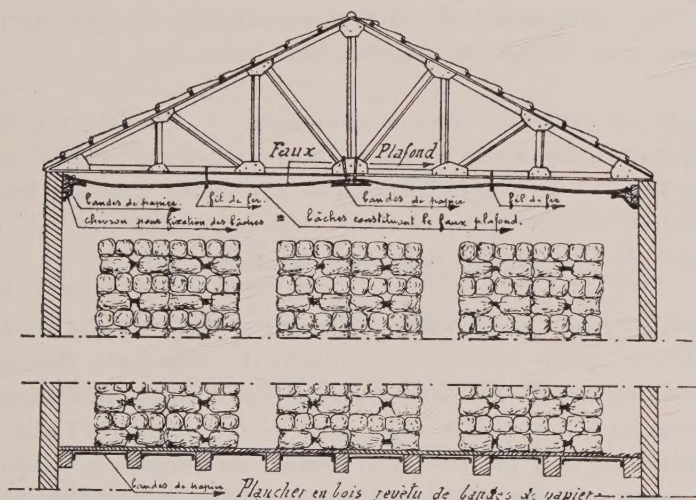


FIG. 1.

l'apposition, sur ces joints, de bandes de papier collées à la colle de pâte.

L'emploi d'un papier imperméable constitué de deux épaisseurs de papier bisulfité collées ensemble est particulièrement recommandé pour la constitution des faux plafonds en raison des facilités de pose qu'il présente.

Si le local est situé en étage et qu'il possède un plancher en bois non plafonné, il est indispensable d'en assurer l'étanchéité en collant sous ce plancher des bandes de papier recouvrant toute la surface comprise entre les poutres.

Lorsqu'un bâtiment à plusieurs étages avec planchers en bois est à traiter en entier, en une seule opération, il n'est pas nécessaire de procéder au collage de papier sous chacun

des planchers. On se contente de boucher les grosses fissures s'il y en a et l'on prend la précaution d'augmenter un peu les doses de chloropicrine dans les étages supérieurs pour tenir compte des fuites par les planchers, fuites qui ont pour effet de diminuer la concentration des vapeurs dans ces étages et de l'augmenter dans les étages inférieurs.

Enfin, si, malgré toutes les précautions qu'on pourrait prendre, il apparaît impossible d'obtenir, dans un magasin, une étanchéité suffisante, il faut recourir au procédé de traitement sous bâches exposé plus loin.

DOSE DE CHLOROPICRINE A EMPLOYER. — En été, quand la température est élevée et que le local à traiter est *parfaitement étanche*, une dose de 20 grammes par mètre cube du local à désinsectiser peut suffire. Dans tous les autres cas, il vaut mieux aller jusqu'à 30 grammes par mètre cube.

INTRODUCTION DE LA CHLOROPICRINE. — Les vapeurs de chloropicrine ayant tendance, en raison de leur forte densité, à s'accumuler dans les parties basses des locaux, l'évaporation doit se faire à la partie supérieure de ces derniers. Cette évaporation ne doit pas être trop rapide, de manière à maintenir un temps notable une forte action parasiticide, assez rapide cependant pour que la concentration de vapeurs dans le local atteigne dès le début un effet utile. L'emploi d'appareils Vermorel et d'arrosiers avec la pomme est à proscrire formellement en raison de l'évaporation trop rapide qui se produit et des dangers d'intoxication qui peuvent en résulter pour les opérateurs.

Le meilleur procédé consiste à verser la chloropicrine dans des bacs en bois disposés au-dessus des piles de sacs où elle s'évapore progressivement. Ces bacs, constitués avec des planches assemblées par pointes, avec joints lutés au plâtre, doivent présenter une grande surface d'évaporation et la hauteur du liquide dans chacun d'eux ne doit pas dépasser 5 à 6 centimètres (fig. 2). Leur nombre et leurs dimensions sont à calculer en conséquence.

L'emploi de pompes pour la répartition de la chloropicrine dans les bacs n'est pas recommandé, à cause des fuites possi-



bles et des inconvénients qui en sont la conséquence. Il est préférable de répartir la chloropicrine dans des récipients, des bidons à essence, par exemple, d'une contenance sensiblement égale à la quantité de chloropicrine prévue par bac. On dis-

FIG. 2. Bac en bois

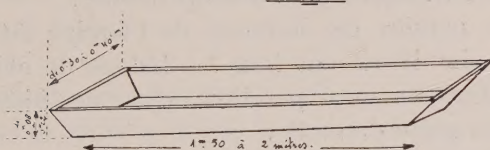


FIG. 3.

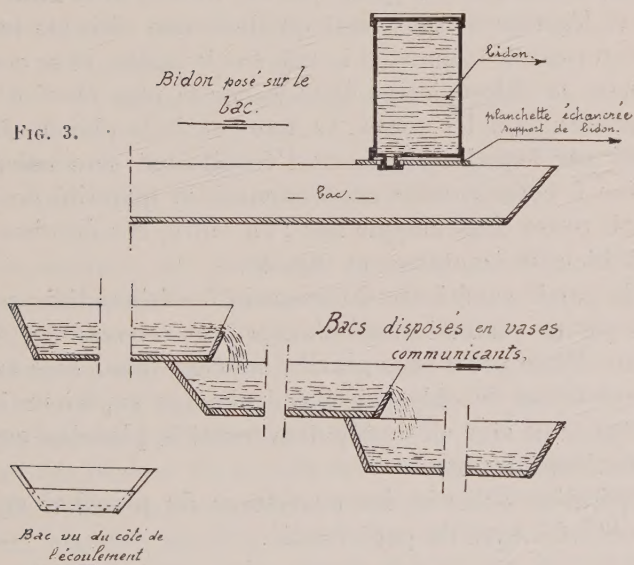


FIG. 4.

tribue d'avance ces bidons sur les bacs (1 par bac), en les faisant reposer sur une planchette échancrée pour le passage du goulot et posée sur les bords supérieurs du bac (fig. 3). Au moment de l'opération, les hommes de l'équipe enlèvent simultanément les bouchons, au commandement, retournent les bidons et se retirent dès qu'ils ont constaté que le liquide commence à s'écouler. Ils calfeutrent la porte de sortie avec

des bandes de papier collé, sans oublier les fentes ni le trou de serrure.

Les bidons se vident d'eux-mêmes par gravité. On laisse le tout en place pendant une dizaine de jours. Ce procédé de distribution de la chloropicrine a l'avantage d'être très rapide, de doser exactement la quantité à introduire et de présenter le minimum de risques pour les opérateurs.

Lorsque le nombre des hommes de l'équipe est insuffisant pour ouvrir simultanément tous les bidons de chloropicrine, il convient de commencer par l'ouverture des bidons les plus éloignés de la porte de sortie.

Si l'on se trouve dans un magasin où le sommet des piles est peu accessible, on peut placer, dans l'intervalle de ces piles et légèrement plus haut qu'elles, une série de bacs disposés en cascade comme on le voit sur la figure, et se contenter de verser la chloropicrine dans le bac le plus élevé d'où elle se répandra dans les autres. La hauteur de la planche formant le côté par lequel s'effectuera l'écoulement sera calculée de manière à correspondre exactement à la quantité de liquide qui doit rester dans chaque bac ; en outre, ces derniers seront placés bien horizontalement (fig. 4).

Si la partie supérieure du magasin à désinsectiser est constituée par un plafond percé d'ouvertures convenables, ou susceptible d'être percé sans grand dommage (planchers en bois), on peut verser la chloropicrine de l'étage supérieur à l'aide d'un tuyau de zinc ou de tôle traversant le plancher supérieur et aboutissant au bac.

L'opération achevée, les ouvertures du plancher supérieur sont obturées avec du papier collé.

OUVERTURE DES MAGASINS. — Après s'être assuré qu'aucune fuite n'est à craindre, les magasins sont laissés en état pendant une dizaine de jours au moins, pendant lesquels on surveille les alentours pour vérifier qu'aucune fissure ne s'est produite et la boucher le cas échéant.

Quand la chloropicrine a agi, on décolle le papier autour et à la base des portes et des fenêtres et on les ouvre pour établir un courant d'air dans le local jusqu'à disparition d'odeur suffocante et de picotement des yeux.



Dans la plupart des cas, une aération de quelques heures suffit pour éliminer, à des traces près, les vapeurs de chloropicrine et permettre l'accès des magasins, même sans masque.

Pendant cette aération, il n'y a pas de précaution particulière à prendre, d'ordinaire, dans le voisinage immédiat des locaux, les vapeurs de chloropicrine qui s'échappent de ces derniers étant à dose insuffisante pour vicier d'une manière nuisible l'air extérieur.

CONSTATATION DES RÉSULTATS. — Après disparition complète des vapeurs de chloropicrine, faire des sondages dans les piles en prenant des sacs à différents endroits. Prélever sur ces sacs des poignées de grains et les passer au crible à main pour s'assurer que les charançons ont bien été détruits.

#### B. — TRAITEMENT SOUS BÂCHES.

Le mode de traitement sous bâches peut être employé quelles que soient les quantités de blé à traiter.

ETABLISSEMENT DU DISPOSITIF ÉTANCHE. — Pour constituer un dispositif étanche, recouvrant entièrement le lot à traiter, on édifie autour du lot une charpente légère, constituée par des perches placées debout et fixées au sol par des dés en plâtre, et on les relie à la partie supérieure par des perches ou chevrons disposés horizontalement (fig. 5). Sur cette charpente on tend des bâches, du modèle courant du commerce, enduites à l'huile de lin cuite ou confectionnées avec du tissu très serré, de telle manière qu'elles soient supportées à la fois par la charpente et par des sacs, placés debout sur le sommet des piles, ou par des fils de fer tendus d'une partie à l'autre de la charpente.

On ménage entre le sommet des piles et les bâches un espace libre de la hauteur d'un sac et l'on y installe les bacs en bois.

Sur les côtés, on fait descendre les bâches jusqu'au sol où elles sont plaquées par une bordure de glaise fraîchement délayée. Bien prendre la précaution de faire descendre les bâches jusqu'au sol et non jusqu'au faux plancher, sans cela les vapeurs de chloropicrine passeraient à travers les interstices

des planches et se répandraient à l'extérieur du dispositif étanche.

On profite des joints supérieurs des bâches pour installer des tuyaux en tôle qui, aboutissant aux bacs et ressortant à l'ex-

### Traitement sous lâches

FIG. 5.

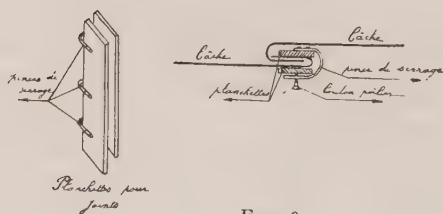
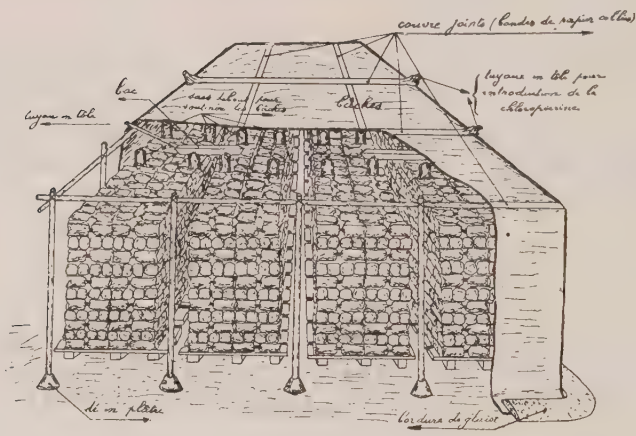


FIG. 6.

térieur des bâches, serviront de conduits pour l'introduction de la chloropicrine.

Pour assurer l'étanchéité du dispositif, on recouvre tous les joints de bandes de papier collées à la colle de pâte ; on raccorde également par un collage de papier les tuyaux de tôle aux bâches, de façon à ne laisser aucune fissure par où pourraient passer les vapeurs de chloropicrine.

Au lieu de bâches, on peut employer du papier imperméable



constitué par deux épaisseurs de papier bisulfité collées ensemble.

L'étanchéité des joints de bâches peut aussi être obtenue en repliant l'un dans l'autre les bords de celles-ci et en maintenant le joint ainsi obtenu entre deux lames de bois serrées par des pinces en U munies d'un boulon poêlier (fig. 6).

Ce procédé, demandant plus de temps et étant plus onéreux que le simple collage de bandes de papier, ne doit être employé qu'exceptionnellement, lorsque le collage du papier sur les bâches ne peut être envisagé.

**DOSE DE CHLOROPICRINE A EMPLOYER.** — 30 grammes par mètre cube de l'espace enveloppé par le dispositif étanche.

**INTRODUCTION DE LA CHLOROPICRINE.** — La chloropicrine, préalablement répartie dans des récipients de contenance appropriée, est versée dans les bacs par l'intermédiaire des tuyaux en tôle disposés à cet effet. Après cette opération, l'ouverture extérieure des tuyaux est bouchée avec du papier posé comme un couvercle et collé sur la surface extérieure du cylindre. La hauteur de la nappé de chloropicrine dans les bacs ne doit pas dépasser 5 centimètres.

**OUVERTURE DES BACHES.** — Les blés sont laissés sous l'action de l'insecticide pendant une douzaine de jours. A l'expiration de ce délai, on soulève les bâches pour faire partir le reste des vapeurs de chloropicrine et, après quelques heures, on enlève définitivement les bâches.

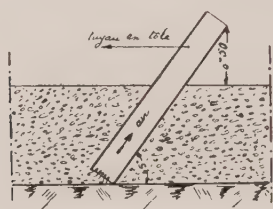
**OBSERVATION.** — Peu après l'introduction du liquide insecticide dans les bacs, une odeur assez prononcée se dégage alentour, due au passage d'une certaine quantité d'air, chargé de vapeurs de chloropicrine, à travers le tissu des bâches. Ces fuites par expansion ne se prolongent d'ailleurs guère au delà d'un ou deux jours et n'entraînent que des pertes de vapeurs peu importantes. Il est néanmoins prudent, si le traitement sous bâches s'effectue dans un local qui doit rester libre à la circulation, de l'aérer fortement pendant toute la durée du traitement et de n'y pénétrer qu'avec précaution pendant les

premières vingt-quatre heures au moins qui suivent le début de l'opération.

### C. — TRAITEMENT DES BLÉS EN COUCHES.

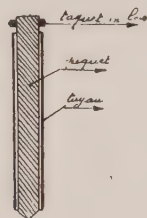
Les vapeurs de chloropicrine ne pénètrent que très difficilement dans les couches de blé en raison de l'air retenu entre les grains ; aussi est-il nécessaire de faciliter la pénétration des vapeurs par un dispositif d'évacuation de l'air.

Après réalisation de l'étanchéité des magasins, dans les con-



*Position des tuyaux dans la  
couche de blé*

FIG. 7.



*Tuyau équipé pour  
l'enfoncement*

FIG. 8.

ditions exposées ci-dessus pour le traitement par magasins entiers, on place dans la couche de blé des tuyaux en tôle uniformément répartis, à raison d'un tuyau tous les 5 à 6 mètres carrés, enfoncés sous un angle de  $45^\circ$  environ et dépassant la couche d'une cinquantaine de centimètres (fig. 7).

L'enfoncement de ces tuyaux est effectué à l'aide d'un piquet en bois d'un diamètre légèrement inférieur au diamètre intérieur du tuyau et emboîté dans ce dernier. Des taquets de bois sont cloués à la partie supérieure du piquet pour former épaulement et entraîner le tuyau dans la couche de blé (fig. 8). Après la mise en place du tuyau, on retire le piquet qui sert à l'enfoncement des autres tuyaux.

**DOSE DE CHLOROPICRINE A EMPLOYER.** — Il convient de ne pas descendre en dessous de 30 grammes de chloropicrine par mètre cube du volume total du local traité.



DISPERSION DE LA CHLOROPICRINE. — La chloropicrine doit être répandue directement à la surface de la couche de blé et non versée dans des bacs.

On divise la quantité totale de chloropicrine à employer dans une série de récipients à large goulot (carafes en verre par exemple). Ce transvasement doit être effectué à l'air libre, en plaçant les carafes sur le sol, de sorte que les vapeurs de chloropicrine qui se dégagent et s'écoulent vers le bas n'atteignent pas la figure de l'opérateur.

Les carafes sont ensuite transportées dans le local à traiter et disposées debout sur la couche de blé en les répartissant convenablement. A partir de la région la plus éloignée de la porte de sortie, le contenu des carafes est répandu sur le tas de blé, aussi uniformément que possible sur les espaces qui séparent une carafe de la suivante et en évitant absolument de faire tomber de la chloropicrine dans les tuyaux d'évacuation d'air.

Cette opération est faite simultanément par tous les hommes de l'équipe. Elle doit être conduite avec beaucoup de méthode et rapidement pour réduire au minimum le séjour des opérateurs dans l'atmosphère infectée, en évitant cependant toute précipitation qui pourrait nuire à la bonne exécution de l'opération et qui pourrait, de plus, produire l'essoufflement et diminuer ainsi l'efficacité du masque.

Quand toute la chloropicrine a été déversée, les opérateurs sortent immédiatement du local dont la porte est soigneusement calfeutrée avec des bandes de papier encollé.

Le blé est laissé une dizaine de jours sous l'action de la chloropicrine, après quoi on procède à l'ouverture du magasin dans les conditions exposées plus haut pour le traitement des blés en sacs.

#### D. — TRAITEMENT EN SILOS.

Je ne m'étendrai pas dans ce mémoire sur le traitement par la chloropicrine des grains de blé placés en silos. Ce traitement repose sur les mêmes principes que les traitements en magasins, sous bâches ou en couches, mais il présente des modalités variables avec les types de construction des silos, en

particulier selon que ceux-ci permettent ou non la ventilation de la masse de grains qui s'y trouve. L'exposé des tentatives qui ont été faites occuperait une place d'autant plus excessive que la proportion du blé mise en silos n'atteignait pas 3,5 p. 100 du stock et que de nouvelles expériences sont nécessaires pour en fixer des règles.

RÉSULTATS. — L'importance des lots qui ont été soumis à l'action de la chloropicrine, en une seule opération, a varié de 200 à 130.930 quintaux. Cette dernière quantité a été traitée avec succès, en octobre 1935, aux Magasins généraux de l'île Saint-Denis. Elle représentait un volume de 29.000 mètres cubes occupant une surface de 3.700 mètres carrés, les sacs étant disposés à plat sur 18 rangs de hauteur.

Au cours des expériences de contrôle qui ont été renouvelées, on a cherché si la chloropicrine avait une action sur le gluten et sur le pouvoir germinatif.

8 échantillons provenant d'un même blé, avant et après traitement, ont été envoyés à 4 laboratoires : le laboratoire de chimie alimentaire de l'Inspection générale des Subsistances ; le laboratoire des blés et farines du Centre national de recherches agronomiques de Versailles ; le laboratoire de l'Ecole française de meunerie et le laboratoire de contrôle des farines de l'Institut national agronomique.

Les résultats obtenus à l'extensimètre Chopin n'ont pas montré de différence entre les glutens du blé traité et du blé non traité.

Le laboratoire de l'Institut agricole de Toulouse a constaté, d'autre part, que la chloropicrine n'a aucun effet nuisible sur le gluten du blé et que ce dernier, après traitement, a conservé sa valeur boulangère ; enfin, que la faculté germinative des grains restait normale après traitement (96,2 p. 100).

\*  
\* \*

En conclusion, il résulte des expériences et des observations qui ont été faites sur le stock de sécurité :

Que les blés en couches et en silos titrant plus de 13 à 14 p. 100 d'humidité ne peuvent être conservés qu'à condition



d'être soumis à des pelletages continuels. Il serait à désirer, pour la bonne conservation de ces blés, que les silos fussent pourvus de « conditionneurs » permettant le séchage artificiel.

Que les blés en sacs, au contraire, contenant parfois jusqu'à 16 p. 100 d'humidité, se sont conservés sans aucune manutention. Le stockage en sacs paraît donc préférable lorsqu'on doit conserver de grandes quantités de blés français. La seule précaution à prendre est de ne pas constituer un arrimage trop compact, de ne pas dépasser, par exemple, des piles d'une largeur de quatre sacs placés bout à bout, séparées entre elles par des passages de 1 mètre.

Il résulte des mêmes opérations et expériences en grand avec le stock de 1935 que les magasins qui conviennent le mieux sont ceux construits en matériaux épais, où la température reste à peu près constante, les variations de la température favorisant des invasions d'insectes plus ou moins graves.

Que les masses compactes de blé offrent une résistance considérable à la transmission de la chaleur et, que, en conséquence, les blés transportés en été se conservent moins bien que ceux qui ont voyagé pendant l'hiver.

Enfin, que la destruction des insectes et des rongeurs par la chloropicrine constitue un procédé radical. L'emploi de ce produit nécessite des magasins dont l'étanchéité est facile à réaliser. Il permet de débarrasser les grains de tous les parasites sans leur faire subir aucun pelletage, ni aucune manutention, et il est très économique lorsque les locaux s'y prêtent.

A défaut de magasins étanches, on peut procéder à la désinsectisation sous bâches, mais, d'une part, il est nécessaire d'augmenter les doses de produit et, d'autre part, la location et l'installation des bâches rend l'opération sensiblement plus onéreuse.

Dans certains centres de stockage, où le traitement sous bâches a été opéré, le prix de l'opération est monté à 0 fr. 60 par quintal, alors qu'il ne dépassait guère 0 fr. 25 dans des magasins d'une étanchéité certaine.

Tels sont les principaux enseignements que le Service des Céréales a pu tirer d'une entreprise de stockage qui, jusqu'à ce jour, n'avait jamais été réalisée dans notre pays par une Administration publique avec une aussi grande ampleur.

## CARACTÈRES GÉNÉRAUX ET BIOCHIMIQUES DE QUARANTE SOUCHES DE BACILLES MUQUEUX

par M. LÉVY-BRUHL et M<sup>lle</sup> YVONNE CADO,  
avec la collaboration de M. HURI.

Les bacilles dits muqueux ou capsulés, groupés dans les nomenclatures bactériologiques sous les dénominations de *Klebsiella* ou d'*Aerobacter*, et dont le type le plus étudié est le *Pneumobacille* décrit par Friedländer en 1882, se caractérisent, avant tout, par un ensemble d'aspects macroscopiques et microscopiques liés à la présence d'une enveloppe gommeuse péri-microbienne, dont la nature hydrocarbonée est actuellement bien établie. C'est elle qui conditionne l'apparence si spéciale des colonies sur gélose, ainsi que leur consistance particulière, de même que la collerette qui se forme à la surface du milieu liquide, le « clou » si caractéristique dans le tube de gélatine ensemencé par piqûre; et au microscope, la « capsule » entourant le corps microbien (\*). Par ailleurs, ces bactéries sont Gram-négatives, immobiles, dépourvues de spores. Elles poussent abondamment sur les milieux usuels, aussi bien à la température du laboratoire qu'à l'étuve, et se montrent saccharolytiques, non protéolytiques.

L'étude de leurs propriétés biochimiques permet, d'une part, de distinguer cette famille microbienne de celle des *Escherichia*, d'autre part, d'y introduire des subdivisions : l'une de ces variétés se distingue nettement du *Pneumobacille* par un ensemble de réactions biochimiques, c'est le *Bacillus mucosus capsulatus* (Fashing 1890), assez proche du Bacille du rhinoclélrome déjà décrit par von Fritsch, en 1882 ; il en est de même du bacille du granulome inguinal *Calymmato-bacte-*

(\*) Le rôle capital, joué par ces substances dans la production des réactions d'immunité, a été mis en lumière par les beaux travaux de l'Institut Rockefeller. Cet aspect du problème biochimique sera laissé de côté au cours du présent article.



*rium granulomatosis* de Beaurepaire-Aragao et Vianna (1912) Par contre, le *Bacterium aerogenes* constitue une espèce bactérienne toute voisine du bacille de Friedländer, au point que la plupart des auteurs considèrent ces deux variétés comme identifiables l'une à l'autre.

Ayant pu réunir un assez grand nombre de ces bactéries muqueuses, les unes isolées par nous dans des cas pathologiques divers, les autres obligeamment transmises par des Instituts scientifiques ou des travailleurs que nous remercions bien vivement, nous avons noté les caractères généraux et biochimiques de ces germes, caractères dont certains apparaissent comme présentant une valeur diagnostique incontestable. Ce sont les résultats de ces recherches que nous apportons ici, nous proposant de poursuivre cette étude et de la compléter sur un assez grand nombre de points.

Si certains faits relatés au cours de cet exposé nous paraissent présenter un réel intérêt, il semble difficile actuellement d'en tirer des conclusions générales permettant une classification tout à fait précise. A côté des échantillons typiques, indentifiables soit comme Pneumobacille, ou *Bacterium lactis aerogenes*, soit comme *Bacillus mucosus capsulatus*, se distinguant des colibacilles par un ensemble de caractères bien tranchés, on rencontre des germes intermédiaires, classés par les bactériologistes français comme des para-colibacilles muqueux et qui ont fait l'objet des recherches récentes de Tittsler et Sandholzer (1) et de Prange (2), ce dernier auteur les rattachant au *Bacterium acidi lactici* de Hueppe. Le problème se complique encore par suite de la non-fixité de certains caractères présentés par ces bactéries. La mutabilité de ces germes avait déjà été signalée par Zinsser et Bayne-Jones (3), en France par R. Legroux dans ses leçons de l'Institut Pasteur et ses travaux en collaboration avec Gory (4). A l'étude de ces

(1) TITTLER et SANDHOLZER. Studies on the « *Escherichia aerobacter intermediates* ». *J. of Bact.*, **24**, 1935, p. 349-365.

(2) PRANGE (G.). *Bacterium acidi lactici* (Hueppe) und seine systematische Stellung auf Grund seiner Eigenschaften. *Zentbl. f. Bact.*, II. Abt. Orig., **92**, 1935, p. 305-336.

(3) ZINSSER et BAYNE-JONES. *Text. Book of Bact.*, 7<sup>e</sup> éd., 1935, p. 546.

(4) GORY (M.). Action des eaux résiduaires sur quelques bacilles intestinaux et sur le bacille du côlon. *Th. med. Paris*, 1926.

phénomènes de *mutation bactérienne*, nous avons pu nous-mêmes apporter récemment une contribution (5).

#### ORIGINE DE NOS ÉCHANTILLONS.

Nous avons eu entre les mains une cinquantaine de souches dont une trentaine ont été isolées par nous chez des sujets atteints d'infections diverses. Les autres proviennent de collections : de l'Institut Pasteur (dues au D<sup>r</sup> Legroux), de la National Collection of Lister Institute (D<sup>r</sup> S<sup>r</sup> John Brooks), de l'Institut bactériologique de Lyon (Professeur Rochaix), ou nous ont été fournies par nos confrères et amis M<sup>me</sup> le D<sup>r</sup> Aitoff, Beauvy, Demanche, Lavergne. Toutes ces souches sont d'origine humaine, provenant de suppurations, de rhino-sclérome (n° 1926, collection Nationale, Londres), de granulome inguinal (Gran). En outre, grâce au D<sup>r</sup> Robic de l'Institut Pasteur de Tananarive, nous avons pu étudier des échantillons d'origine animale provenant de septicémies spontanées du cobaye observées à Madagascar (S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>7</sub>).

#### CONDITIONS GÉNÉRALES DE DÉVELOPPEMENT.

Nos observations personnelles confirment les données classiques sur le peu d'exigence de ces bactéries, ce qui explique leur ubiquité dans la nature et leur présence comme saprophytes habituels dans le règne animal. Ils peuvent, en effet, se développer sur des milieux très simples, soit naturels (pomme de terre, eau de levure), soit synthétiques, poussant à toute température entre 15° et 41°, avec une zone de pH très large. Mais, par contre, un certain nombre de ces échantillons ont présenté une tendance très nette à l'autolyse; au bout de peu de temps, les cultures se montraient particulièrement visqueuses, puis coulantes, puis transparentes et les repiquages cessaient de pouvoir être effectués. C'est ainsi

(5) LÉVY-BRUHL et CADO. I. Un cas de mutation bactérienne, chromogénèse apparue dans une souche de *Pneumobacille* conservée depuis dix-huit mois. *C. R. Soc. de Biol.*, **117**, 1934, p. 1160. II. Nouveau cas de mutation observé dans le groupe du *Pneumobacille*. *C. R. Soc. de Biol.*, **122**, 1936, p. 1246.

que nous avons perdu une douzaine de nos bactéries avant d'avoir pu les étudier d'une façon suffisante.

Ces phénomènes d'autolyse ne paraissent pas avoir encore été décrits dans cette famille microbienne. Cependant, notre collègue Dujardin-Beaumetz a observé bien souvent des faits de cet ordre au cours de ses recherches sur les germes muqueux isolés dans l'ozène et dans les rhinites atrophiques. Pas plus que nous, il n'a pu obtenir la réalisation en série de cette lyse bactérienne.

#### ASPECT MACROSCOPIQUE DES CULTURES.

En *milieux liquides* (bouillon simple ou glucosé, eau peptonée, milieu T), le développement est rapide et abondant (deux à six heures à 37°), la croissance se produisant plus ou moins vite suivant les échantillons. On note d'abord un trouble homogène, puis des ondes moirées et, au bout de six à dix heures habituellement, le début d'une *collerette* qui, en un à deux jours devient fort nette et parfois très épaisse; il peut se former également un voile occupant toute la surface du liquide.

Ces bactéries étant essentiellement aérobies, l'ensemencement en fioles d'Erlenmeyer à grande surface d'aération est particulièrement favorable pour la récolte microbienne, de même que pour l'étude des processus d'oxydation, notamment en milieu synthétique.

Sur *milieux solides usuels* (gélose au bouillon simple) on obtient des colonies arrondies, saillantes, nettement muqueuses d'aspect, de consistance glaireuse, plus ou moins filantes au contact de l'anse de platine. Ce caractère se marque davantage encore quand on a incorporé au milieu un sucre, par exemple le glucose dans la proportion de 2 à 5 p. 1.000. Plus encore que le glucose, le saccharose, d'après les observations de Fernbach et Schoen (6) favoriserait la production de la substance gommeuse, et ces auteurs ont étudié des bactéries ne

(6) FERNBACH, SCHOEN et HAGIWARA. Quelques observations sur la formation des gommés par les bactéries. *C. R. Soc. de Biol.*, **92**, 1925, p. 1418-1419.



produisant leur gomme qu'en milieu saccharosé; nous n'avons pas rencontré personnellement de tels échantillons au cours de nos recherches. Dans l'ensemble, toutes nos souches ont revêtu cet aspect muqueux, mais des nuances ont pu être relevées, particulièrement en ce qui concerne le caractère filant des colonies. Celui-ci faisait presque complètement défaut pour les souches 1926, N et PP<sub>4</sub> qui se sont révélées par la suite comme très atypiques. Il était au contraire très marqué, de même que l'apparence muqueuse, pour les échantillons Chal., Berth., 1438, Gourd et Ver., qui, par leurs propriétés biochimiques se sont classés dans le groupe du *Bacillus mucosus capsulatus*. L'aspect des colonies peut se trouver modifié à la suite de repiquages en série, comme l'avait déjà noté Julianelle (7). De même que cet auteur, nous avons vu apparaître, à côté du type classique, muqueux, humide, dit *smooth*, des formes sèches, non muqueuses, *rough*. Ces dernières présentent deux variétés : des colonies petites, transparentes, entourées d'un cercle brillant, et d'autres plus larges, en touffe de coton. Vus au microscope, les germes se montrent dépourvus de capsule et l'on sait que ces éléments sont avirulents pour l'animal alors que les colonies *Smooth* présentent habituellement un pouvoir pathogène assez marqué.

Sur *sérum coagulé*, on obtient des cultures abondantes, d'aspect visqueux, sans le moindre indice de liquéfaction du milieu, même après un temps d'incubation prolongé.

En *gélatine*, ensemencée par piqûre, les bactéries se multiplient et produisent, en deux à trois jours, à la température du laboratoire, le *clou* caractéristique, à tête étalée à la surface du milieu, tantôt globuleuse, tantôt aplatie, surmontant une pointe fine. Cet aspect, déjà signalé par Friedlander, constitue un des bons éléments d'identification microbiologique. Ce clou persiste habituellement sans modification ultérieure autre que l'apparition inconstante de quelques bulles de gaz, mais, comme nous le rapporterons au chapitre relatant les propriétés biochimiques de nos germes, un certain nombre

(7) JULIANELLE. Bacterial variations in cultures of Friedländers *Bacillus*. *J. of. exp. med.*, **47**, 1928, p. 889-902.

d'entre eux ont déterminé tardivement une gélatinolyse très nette.

Sur *pomme de terre* glycerinée ou non, on obtient un développement abondant des bacilles, sous forme d'un enduit épais, généralement grisâtre. C'est sur ce milieu que se manifeste avec le plus de netteté la production de pigments, dont nous avons rapporté récemment deux exemples.

Si la *chromogénèse*, en ce qui concerne les bactéries des groupes Typhique et Coli, a fait l'objet de travaux assez nombreux, elle ne paraît guère avoir été, jusqu'ici, signalée et étudiée dans la famille des *Klebsiella*. Rappelons cependant que Krauss (8) en 1926 avait décrit un bacille muqueux protéolytique et chromogène qu'il désigne sous le nom de *Bacterium mucosum mutabile*. Tout récemment, M<sup>mes</sup> Aitoff, Dobkewitch et Dion (9) ont isolé, dans les selles d'un malade atteint d'entérite, un germe à culture jaune d'or proche du *Pneumobacille*. De ce groupe, on peut rapprocher également une bactérie chromogène étudiée par Hauduroy, Duhamel, Ehringer et Mondin (10), et provenant d'une méningite. Des deux bacilles que personnellement nous avons vu se pigmenter, l'un ne donnait, sur les milieux courants (gélose glucosée), qu'une teinte faiblement rosée, alors qu'après ensemencement sur la pomme de terre on obtenait une coloration franchement rouge; par ailleurs, ce germe avait conservé tous les caractères qui l'ont fait classer comme *Bacterium lactis aerogenes*, dans la National Collection de l'Institut Lister dont il provient. L'autre échantillon chromogène que nous avons observé produisait, au contraire, un pigment jaune d'or dans tous les milieux usuels, cette propriété n'étant apparue qu'au bout de dix-huit mois de conservation du germe au laboratoire; en même temps les réactions caractéristiques du *Pneumobacille* s'étaient atténuées en sorte que la bactérie se présentait comme atypique;

(8) KRAUSS (E. J.). Ueber ein neues für Menschen pathog., Kaselbakterium. *Zentbl. f. Bakt.*, I. Abt. Orig., **89**, 1926, p. 497-505.

(9) AITOFF (M.), DOBKEWITCH (H.) et DION (M.). Bacille jaune isolé d'une entérite aiguë et présentant les caractères du Bacille de Friedländer. *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 710-711.

(10) HAUDUROY, DUHAMEL, EHRINGER et MONDIN. Sur un bacille inconnu retiré d'une méningite. *C. R. Soc. de Biol.*, **110**, 1932, p. 362-364.

elle était, en outre, devenue autolysable et fragile et ne put être conservée longtemps par repiquages.

#### ASPECT MICROSCOPIQUE.

Observés entre lame et lamelle, à l'état frais, les germes apparaissent comme de petits bâtonnets opalins, de largeur sensiblement constante, mais de longueur très inégale.



FIG. 1. — Aspect filamenteux. Souche Guimb... Culture en milieu T. Coloration Gram-fuschine. Gross. : 1.850 (Photo Jeantet, Institut Pasteur).

DIMENSIONS. — Les classiques indiquent pour le *Pneumobacille* une largeur de  $0\ \mu\ 2$  à  $0\ \mu\ 3$  sur une longueur de  $0\ \mu\ 6$  à  $1\ \mu\ 5$  ; ces données nous ont paru exactes dans l'ensemble, ne constituant cependant qu'une moyenne valable pour la plupart des échantillons. Deux de nos souches se sont montrées nettement atypiques à cet égard : l'une d'elles (Guimb.) se présentait en culture comme filamenteuse avec des éléments longs de 3 à 6  $\mu$  ; l'autre, au contraire (Bourd), affectait une appa-



rence cocco-bacillaire, avec un très grand nombre de germes cocciformes et, de temps en temps, un bacille plus ou moins allongé, le diamètre des grains mesurant de  $0\ \mu\ 25$  à  $0\ \mu\ 30$ . Ce dernier aspect a été décrit dans certains produits pathologiques (expectoration en particulier) mais non, semble-t-il, dans les cultures.

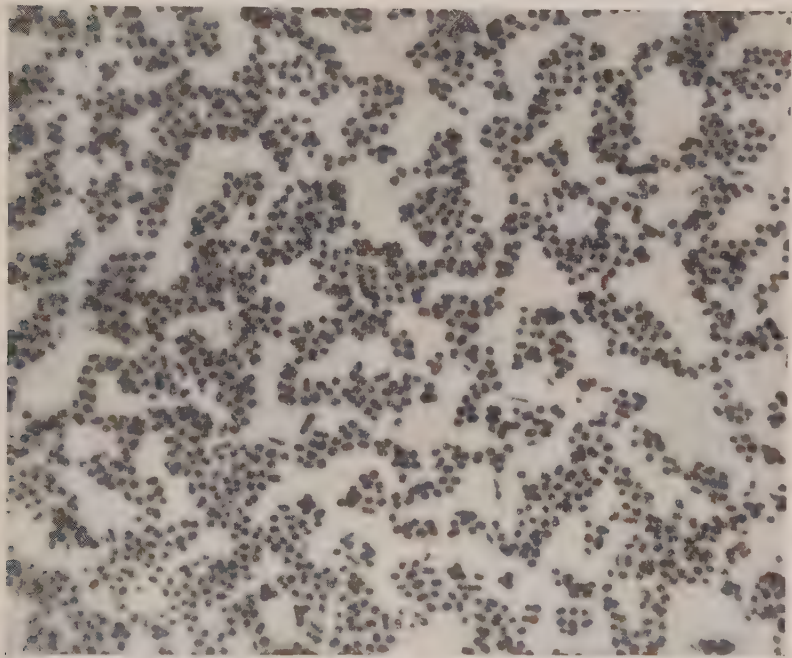


FIG. 2. — Aspect cocciforme. Souche Bourd. Culture en milieu T. Coloration Gram-fuchsine. Gross. : 1.850 (Photo Jeantet, Institut Pasteur).

**MOTILITÉ.** — On sait que certaines bactéries, considérées classiquement comme immobiles, se sont montrées douées de motilité lorsque l'examen a été pratiqué sur des cultures obtenues à une température inférieure à celle de l'étuve (coccobacille de la pseudo-tuberculose : Kossel et Overbeck, Arkwright, Paul Boquet) ou observées dans les toutes premières heures de leur développement (*Bacillus bifermantans* : Sturges et Dreke, Zeissler, Levenson). C'est cette dernière condition

expérimentale que nous avons appliquée à l'étude de nos souches et nous avons eu la surprise d'en trouver 8, c'est-à-dire 20 p. 100 animées de mouvements de translation extrêmement nets, analogues à ceux d'un bacille typhique. Cette motilité nous paraissant devoir se trouver liée à la présence de cils, nous avons demandé à M. Levenson, assistant du Dr Weinberg, à l'Institut Pasteur, de bien vouloir appliquer à l'étude de nos germes mobiles la technique qu'il vient de mettre au point et de publier (11). Par la méthode d'imprégnation à l'argent, il a pu alors mettre en évidence dans un grand nombre de ces éléments microbiens des cils extrêmement nets. De même que les mouvements actifs observés par nous, ils ne caractérisent qu'une phase passagère de la vie de la culture et ont disparu, en général, au bout de six heures. On ne retrouve alors que les éléments immobiles et non ciliés décrits par les classiques.

Avec l'aide du Dr Levenson, nous nous proposons d'approfondir l'étude de cette donnée, de suivre les conditions d'apparition et de disparition des cils, de même que l'apparition des « capsules » qui paraissent leur faire suite, en fonction du temps, de la température d'incubation, de la composition et de la réaction du milieu..

On sait d'autre part que si les types habituels de bacilles muqueux, *Pneumobacille*, *Bacillus lactis aerogenes*, *Bacillus mucosus capsulatus*, bacilles du rhinosclérome et du granulome inguinal se présentent comme dépourvus de toute motilité, il existe une variété microbienne à la fois muqueuse et mobile, c'est le germe décrit par Jordan (12), en 1890, sous le nom d'*Aerobacter cloacae*; c'est vers ce type que semblent évoluer nos germes ciliés qui, dans l'ensemble, présentent, en général, d'autres caractères aberrants, chromogénèse (échantillon 418), pouvoir protéolytique tardif (316, Pl., Remy, 1684, 4474). Les circonstances au cours desquelles nous avons observé ces phénomènes nous ont amenés à les considérer comme des faits de *mutation bactérienne*.

(11) LEVENSON. Coloration des cils bactériens par un procédé simple. Ces *Annales*, **56**, 1936, p. 634-643.

(12) JORDAN. « *Bacillus Cloacae* ». *Rep. Mass. State Board of Health*, Part I, 1890, p. 836.

**COLORABILITÉ.** — Les germes se teignent facilement par les colorants habituels et se montrent indiscutablement Gram-négatifs.

Une fixation bi-polaire de la substance chromatique a été



FIG. 3.



FIG. 4.

FIG. 3. — Cils. Souche 516. Culture de cinq heures en eau peptonée. Préparation de M. Levenson. Gross. : 1.850. (Photo Jeantet, Institut Pasteur).

FIG. 4. — Coloration bipolaire. Souche 720. Culture en milieu T. Coloration à la fuchsine de Ziehl après fixation par l'acide acétique à 1/100. Gross. : 1.850 (Photo Jeantet, Institut Pasteur).

observée par divers auteurs en ce qui concerne les microbes rencontrés dans les humeurs et les lésions expérimentales des



animaux inoculés; nous avons pu la mettre également en évidence dans les bactéries provenant de cultures, après coloration par le bleu polychrome ou par la fuchsine de Ziehl, précédée d'une fixation du frottis à l'acide acétique à 1/100. Les éléments trapus présentent des extrémités fortement teintées séparées par un espace clair; les germes allongés, parfois fi-

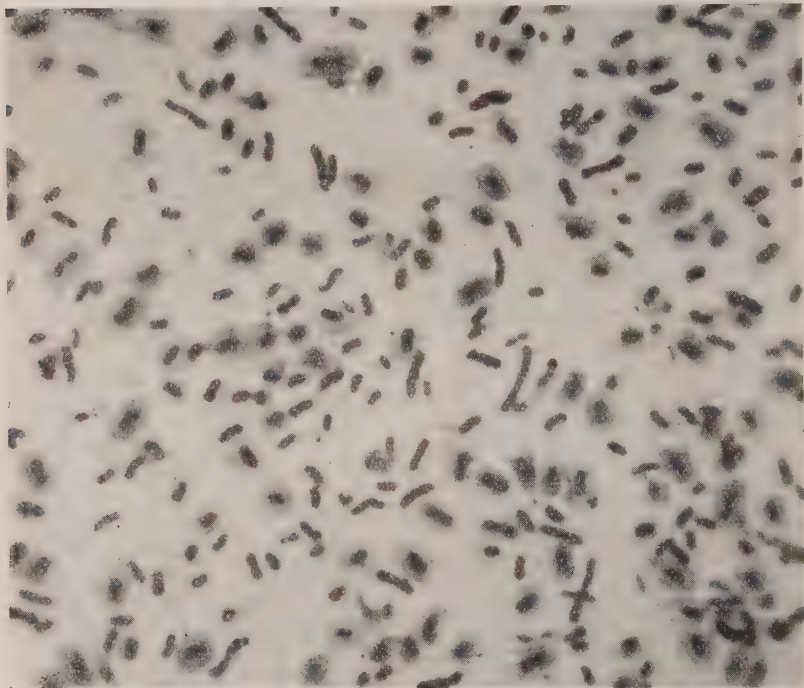


FIG. 5. — Capsules. Souche S7. Culture en milieu T. Coloration bleu polychrome-orcéine après fixation à l'alcool méthylique. Gross. : 1.850 (Photo Jeantet, Institut Pasteur).

lamenteux, montrent une série de corpuscules chromatophiles entre lesquelles se trouvent des zones incolores, ces taches colorées pourraient correspondre aux points où se divisera par la suite l'élément microbien.

**CAPSULE.** — Ce terme, employé couramment pour désigner l'enveloppe qui entoure le corps microbien, constitue en réa-

lité une dénomination impropre, puisqu'il s'agit non pas d'un espace vide, mais d'une zone occupée par une substance hydrocarbonée, du groupe des hémicelluloses (galactanes, mannanes). Nous utiliserons cependant l'appellation classique de capsule, en raison de sa commodité, pour désigner cette formation gommeuse, souvent très épaisse. La mise en évidence en est facile dans les humeurs et lésions des animaux infectés expérimentalement, ainsi que dans les produits pathologiques humains; il en est de même pour les germes provenant de cultures en liquides albumineux. Avec les milieux usuels, au contraire, les méthodes courantes échouent fréquemment, et l'on doit recourir à des procédés spéciaux de coloration ou à l'imprégnation par l'encre de Chine. De nombreuses publications ont été consacrées à cette étude. Nous ne citerons ici que la thèse de Borin (13) où l'on trouve, après un exposé critique des diverses techniques suggérées, l'indication d'un procédé nouveau pour l'utilisation de l'encre de Chine; cette méthode fournit en général des préparations très démonstratives, sans que les résultats puissent être considérés comme constants.

Nous avons également obtenu une très bonne mise en évidence des capsules par la méthode classique du violet aniliné d'Ehrlich, ainsi que par une double coloration bleu polychrome-orcéine, après fixation à l'alcool méthylique.

#### DONNÉES BIOCHIMIQUES.

Nous avons, au cours de ces recherches, employé deux méthodes générales : l'une, celle des milieux synthétiques, permet d'étudier l'utilisation par les diverses souches des éléments minéraux, azotés et carbonés, et donne des indications précieuses sur le métabolisme de ces substances; l'autre, celle des fermentations en tubes à cloche, nous fait saisir les processus d'acidification des divers corps hydrocarbonés et décelé la production de gaz, même en quantité minime. L'une et l'autre de ces méthodes fournissent des épreuves différen-

(13) BORIN (P.). La capsule du *Pneumobacille* de Friedländer, considérations sur les capsules microbiennes. *Thèse Pharmacie*, Paris, 1925.

cielles valables soit pour la distinction des *Klebsiella* d'avec les *Escherichia*, soit pour la répartition des germes muqueux dans les sous-familles que comporte ce groupe.

Pour les cultures en milieux synthétiques, nous avons utilisé, d'une façon générale, la technique indiquée par H. Braun (14) et ses collaborateurs dans leurs importantes études sur le pouvoir de synthèse des bactéries : milieux préparés à l'aide de corps purs, répartis dans des petites fioles d'Erlenmeyer en verre pyrex, ensemencement à partir d'une culture sur gélose, et résultat noté au bout du troisième repiquage, pour éliminer l'influence de substances étrangères à la constitution du milieu.

Nos expériences sur le métabolisme *minéral* de ces bactéries ne nous ont pas encore fourni d'indications très précises ; jusqu'à présent elles confirment les données classiques qui font considérer comme des substances indispensables le phosphore, le soufre, le sodium ou le potassium ; comme des éléments favorisant le fer et le magnésium. La constante saline des milieux synthétiques utilisés d'une façon courante correspondait à la composition suivante, indiquée par Koser (15) et ses collaborateurs :

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| Chlorure de sodium . . . . .     | 5   |
| Sulfate de magnésium . . . . .   | 0,2 |
| Phosphate bipotassique . . . . . | 1   |

pour 1 litre d'eau bidistillée. Le milieu contient, en outre, des traces minimales de fer, de zinc et de magnésium, apportées avec l'eau ou abandonnées par les parois du récipient.

#### NUTRITION AZOTÉE.

UTILISATION DE L'AZOTE AMMONIACAL. — Le développement des bacilles capsulés dans des milieux contenant comme source

(14) BRAUN (H.) et CAHN-BRONNER (C. E.). Ueber die synthetische Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihre biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen. *Zentbl. f. Bakt.*, I. Abt. Orig., **85**, 1921, p. 196-207, 320-331.

(15) KOSER (S. A.). Correlation of citrates utilisation by the members of Colon Aerogenes group with other differential characteristics and with habitat. *Journ. of Bact.* **9**, 1924, p. 61-77.



unique d'azote des sels d'ammoniaque, a été réalisé et étudié par une série d'auteurs ; l'azote ainsi fourni paraît se trouver sous une forme facilement assimilable, car on obtient une récolte rapide et abondante ; ces microbes témoignent donc d'un pouvoir synthétique marqué. Au cours de nos expériences c'est le phosphate d'ammoniaque que nous avons utilisé au taux de 5 grammes par litre, associé à la constante saline indiquée ci-dessus et à un aliment carboné.

UTILISATION DE L'URÉE. — Il a été établi que l'urée peut constituer une source d'azote pour un assez grand nombre de bactéries. Nous nous sommes posé la question de son utilisation par les bacilles muqueux, soit comme aliment azoté en présence d'un élément carboné facilement assimilable tel que le glucose, soit comme source à la fois d'azote et de carbone. Pour réaliser cette épreuve, nous avons préparé les deux milieux suivants :

## A :

|   |     |
|---|-----|
| Urée, en grammes . . . . .                | 3   |
| Glucose, en grammes . . . . .             | 5   |
| PO <sup>4</sup> HK <sup>3</sup> . . . . . | 1   |
| ClNa. . . . .                             | 5   |
| SO <sup>4</sup> Mg. . . . .               | 0,2 |

## B :

|   |     |
|---|-----|
| Urée, en grammes . . . . .                | 6   |
| PO <sup>4</sup> HK <sup>2</sup> . . . . . | 1   |
| ClNa. . . . .                             | 5   |
| SO <sup>4</sup> Mg. . . . .               | 0,2 |

pour 1 litre d'eau bi-distillée. Ces milieux étaient amenés au pH 7,5 par addition d'un peu de soude, puis stérilisés par trois chauffages successifs à 100°, après répartition en petites fioles d'Erlenmeyer.

Alors que le milieu B s'est montré impropre au développement de nos bacilles, le milieu A a fourni pour tous nos échantillons des récoltes abondantes avec, au début, un abaissement considérable du pH qui tombe à 4,5 et même à 4. Puis, au bout de quarante-huit heures, on constate une forte alcalinisation, le pH remontant à 8,5 et même à 9 et s'y maintenant. La première phase correspond à l'acidification du glucose, la seconde à la formation de sels ammoniacaux résultant de la décomposition de l'urée. De ces expériences,

il résulte que, pour les germes étudiés ici, l'urée ne peut constituer la source à la fois d'azote et de carbone. Par contre, associée à un élément carboné, elle fournit un aliment azoté parfaitement assimilable.

UTILISATION DES ACIDES AMINÉS. — Au cours d'expériences précédentes (16) nous avons pu nous assurer que les acides aminés constituent, en général, de bonnes sources d'azote pour les germes muqueux. Il en est ainsi, en particulier, du glyocolle, de l'acide aspartique, de l'histidine, du tryptophane, de la glucosamine. Mis à part le glyocolle, ces composés peuvent servir également de source de carbone et assurer à *eux seuls* avec addition de phosphore, et de la constante saline le développement des microbes. Nous avons vérifié à nouveau cette donnée avec les souches dont l'étude est rapportée ici.

Un point particulièrement intéressant dans les cultures en milieux aminés est l'assimilation de l'histidine et sa transformation en histamine, corps dont on connaît les effets toxiques. Au cours de leurs recherches très suggestives sur cette décarboxylation, A. Berthelot et D.-M. Bertrand (17) montraient, dès 1912, l'action sur l'histidine d'une souche bactérienne dénommée par eux *Bacillus aminophilus intestinalis*, et que ses caractères rapprochaient beaucoup du *Pneumobacille*. Personnellement, ayant constaté la production en milieu synthétique, par certains de nos échantillons, d'une toxine soluble (18) dont l'action rappelle celle de l'histamine nous avons cherché à caractériser ce corps dans nos filtrats toxiques, mais les réactions pratiquées à cet effet se sont montrées négatives.

(16) LÉVY-BRUHL (M.) et M<sup>me</sup> LEGRAND. Culture du *Pneumobacille* sur milieux chimiques définis. *C. R. Soc. de Biol.* **103**, 1930, p. 1070-1071.

(17) BERTHELOT (A.) et BERTRAND (D.-M.). Sur quelques propriétés biochimiques du *Bacillus aminophilus intestinalis*. *C. R. Acad. des Sc.*, **154**, 1912, p. 1826-1828.

(18) LÉVY-BRUHL (M.) et M<sup>me</sup> LEGRAND. Sur la toxine soluble du *Pneumobacille*. *C. R. Soc. de Biol.*, **105**, 1930, p. 263-264. LÉVY-BRUHL et CADO (Y.). Toxine soluble du *Pneumobacille* active chez le lapin, le cobaye et la souris. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 954-955.

UTILISATION DU NOYAU TRYPTOPHANE DES PEPTONES. PRODUCTION D'INDOL. — Une excellente source d'azote est constituée par les peptones, qui, en même temps, fournissent à la bactérie le carbone qui lui est nécessaire. L'utilisation des peptones s'accompagne, dans certains cas d'une attaque de leur noyau tryptophane, laquelle conduit à la production d'indol. Cette réaction caractérise avant tout, le groupe des colibacilles, et son absence au contraire est la règle en ce qui concerne la famille des *Aerobacter*. Cependant dans la plupart des travaux d'ensemble consacrés à ces bactéries, on relève une faible proportion d'échantillons de bacilles muqueux nettement indologènes, et certains auteurs, entre autres Tittsler et Sandholzer ont particulièrement étudié cette variété.

En ce qui nous concerne, sur 42 échantillons éprouvés à ce point de vue, nous en avons trouvé 3, soit 7 p. 100 dont la culture en eau peptonée non glucosée, après incubation à l'étuve pendant six jours, donnait une réaction d'Ehrlich nettement positive. Ce sont les souches 671 et 459 (ozène), de l'Institut Lister, et ozène, du Dr Dujardin-Beaumetz.

UTILISATION DU NOYAU SOUFRE DES PEPTONES. EPREUVE DE LA RÉDUCTION DU SOUS-ACÉTATE DE PLOMB. — Cette réaction, d'une application courante dans l'étude des germes du groupe Colitypho-paratyphique, a été moins usitée au cours des recherches sur les *Klebsiella*. En règle générale, elle donne une réponse négative. Un travail récent de R. Vaughn et Levine (19) montre bien la complexité du problème et les variations dans les résultats obtenus suivant la composition exacte du milieu. En présence de cystine, les auteurs obtiennent la formation de  $H^2S$  avec 100 p. 100 des échantillons de colibacille, 100 p. 100 des souches intermédiaires et 75 p. 100 des *Aerobacter*. Au contraire, dans un milieu contenant 20 grammes de peptone, 15 grammes de gélose, 1 gramme de phosphate bipotassique et 0 gr. 5 de citrate ferrique par litre, la production d' $H^2S$  tombait à un pourcentage de 74 pour les ger-

(19) VAUGHN (R.) et LEVINE (M.). Hydrogene-sulfid production as a differential test in the Colon group. *Jour. of Bact.*, **32**, 1936, p. 65-73.



mes intermédiaires, 1,8 pour les *Escherichia* et 0 pour les *Aerobacter*. Ce même milieu, resté à l'état liquide par suite de la suppression de la gélose, donnait de nouveau 91 p. 100 de résultats positifs avec les « intermédiaires » 93 p. 100 avec les colibacilles et 64 p. 100 avec les *Aerobacter*. On voit combien les conditions expérimentales influent sur le résultat obtenu et comme il est important de les déterminer avec précision.

Personnellement, nous avons appliqué systématiquement cette épreuve à nos échantillons, en utilisant la technique suivante : Ensemencement par piqûres en stries le long de la paroi de verre en tubes de gélose peptonée non sucrée, additionnée de 0,5 p. 100 de sous-acétate de plomb ; tubes non capuchonnés, mis à l'étuve à 37°, résultat noté au bout de vingt-quatre et quarante-huit heures. En opérant ainsi, nous n'avons obtenu de résultats positifs que pour trois de nos souches, les 672, 2.274 et PP 3.

RECHERCHE DU POUVOIR PROTÉOLYTIQUE. — Ensemencées à la surface du sérum coagulé, nos souches ont présenté un développement abondant, mais sans jamais déterminer, même après un temps d'incubation prolongé, la liquéfaction du milieu. Les tubes de gélatine nutritive, inoculés par piqûre, ne présentent pas non plus, en règle générale, de lyse appréciable ; c'est là une donnée classique en ce qui concerne le Pneumobacille, et nos divers échantillons, éprouvés à l'origine, nous ont en effet fourni une réaction négative. Cependant un certain nombre de souches, après repiquages multiples sur gélose, soumis de nouveau à l'épreuve de la gélatinolyse, ont donné un résultat tardivement, mais très nettement positif. Après qu'on eut noté la production d'un clou d'aspect classique, on vit la zone sous-jacente présenter une cupule remplie de microbes ; puis à partir du quinzième jour on constata une véritable fusion de la gélatine à ce niveau ; cette liquéfaction gagna progressivement et lentement vers la profondeur du tube. Ces échantillons avaient acquis, en même temps que ce pouvoir gélatinolytique, un autre caractère aberrant, phase passagère mais très nette de mobilité liée à la présence de cils.

On peut se demander avec Marjorie Stephenson (20) si cette liquéfaction de la gélatine dénote un pouvoir protéolytique véritable, étant donné l'absence de toute action sur le sérum coagulé. Seule la constatation de produits abiurétiques, apparus dans le milieu gélatiné sous l'influence du microbe permettrait de l'affirmer ; c'est ce que nous nous proposons de vérifier.

**RÉDUCTION DES NITRATES.** — On admet depuis les travaux de Grimbart que le *Pneumobacille* réduit les nitrates en nitrites, cette transformation s'accompagnant parfois d'un dégagement gazeux d'azote.

Nous avons procédé à cette épreuve, en utilisant le milieu suivant : Solution à 1 p. 100 de nitrate de potassium dans une eau peptonée à 1 p. 100 portée au pH 7,5, après répartitions en tubes à cloches ; on stérilisait à 120° pendant un quart d'heure. Les tubes,ensemencés à partir de cultures fraîches sur gélose, étaient portés à l'étuve et les résultats notés au bout de cinq jours.

Toutes nos souches, sauf une, fournirent un développement abondant ; un léger dégagement gazeux fut noté dans les tubes 1, 2, Denf, 720, 2651 ; un dégagement important se produisit avec la souche 418. Dans chaque tube de culture nous avons recherché la présence des nitrites au moyen du réactif de Tromsdorff : 0 cent. 5 pour 10 centimètres cubes de culture avec addition de V gouttes d'acide sulfurique. En présence de nitrites même à l'état de traces, on obtient une superbe coloration bleue.

Pour un de nos germes, la souche 418, la réaction fut négative, mais l'abondant dégagement gazeux dans la cloche, nous permet de penser que les nitrates ont été brusquement réduits en azote.

Les souches Lad. et Sub. nous donnèrent une culture assez abondante, mais sans production de nitrites et sans dégagement de gaz.

Tous les autres échantillons nous fournirent une réaction

(20) STEPHENSON (M.). Bacterial metabolism. *Monogr. on Biochemistry*, 1930, p. 185.

nettement positive, cinq d'entre eux produisant un dégagement gazeux généralement peu abondant.

#### NUTRITION CARBONÉE.

L'étude du métabolisme carboné de ces bactéries présente un double intérêt : elle nous renseigne sur la nutrition et le pouvoir de synthèse des germes ; d'autre part, elle fournit une série de tests dont certains ont une grande valeur différentielle, soit pour la distinction des bactéries muqueuses d'avec les bacilles du côlon, soit pour la classification à l'intérieur du groupe des *Klebsiella*. Ce dernier objectif est généralement réalisé par la recherche des réactions de fermentation avec ou sans production de gaz en tubes à cloches ; les autres épreuves, au contraire, comportent principalement des cultures en milieux synthétiques. Ceux-ci ont une composition simple, comprenant la constante saline, un aliment azoté — phosphate d'ammoniaque que nous avons vu être facilement assimilable par ces bactéries — et une source de carbone que l'on fait varier à partir des composés les plus simples.

LES ACIDES ORGANIQUES, SOURCE DE CARBONE. — Le premier à éprouver par ordre de complexité croissante est l'*acide carbonique*. Celui-ci, sous forme de carbonates, s'est montré impropre à assurer la nutrition carbonée de nos germes. On sait d'ailleurs que le nombre des espèces microbiennes qui peuvent se contenter de cette source de carbone est extrêmement restreint.

Les milieux à l'*acide formique* ne nous ont fourni, non plus, aucune culture. Il est vraisemblable que ceci est dû à l'effet toxique exercé par cette substance sur les bactéries, comme sur les organismes supérieurs.

L'*acide acétique* s'est montré au contraire, assimilable, mais par un certain nombre seulement de nos échantillons (23 sur 42). L'utilisation de cette source d'azote ne constitue donc pas une propriété commune à toutes les bactéries muqueuses et ne permet pas de réaliser une épreuve différentielle caractérisant le groupe des *Klebsiella*. Par contre, elle peut



être le point de départ de recherches théoriques d'un intérêt incontestable, car l'acide acétique, source unique de carbone dans ces milieux, se montre particulièrement favorable, par la simplicité de sa molécule, aux études de métabolisme et de bilan carboné. Ce sont des expériences de cet ordre que nous avons entreprises avec le concours du professeur Lemoigne et de M. Devaux, de l'Institut national agronomique, que nous remercions très vivement de leur amicale obligeance. Nous ne rapporterons pas ici le détail de ces recherches relatées dans Yvonne CADO (21), mais simplement quelques données générales sur la vitesse d'utilisation de l'acétate, la proportion de ce corps consommée par la bactérie, et les produits résultant de cette oxydation. Le *Pneumobacille*, en effet, agit comme un ferment oxydant extrêmement actif. Au bout de vingt-quatre heures, dans les fioles où s'effectue le développement microbien, on constate une élévation sensible du pH. Le troisième jour celui-ci atteint déjà 9, puis monte, vers le cinquième ou le sixième jour à 9,5 et même 10, niveau auquel il se maintient pendant des semaines, voire pendant des mois. En même temps, on note une abondante récolte microbienne et les germes restent vivants malgré la très grande alcalinité du milieu. La consommation de l'acétate est déjà notable au cours des premières journées d'incubation, elle progresse très intensément du cinquième au huitième jour, puis se ralentit sensiblement. Au quinzième jour la consommation du carbone initial se stabilise autour de 85 p. 100. Une petite partie de ce carbone est utilisée à la formation des protéines microbiennes. Le reste a été recherché sous forme de composés organiques.

Nous n'avons pu mettre en évidence aucun acide volatil en dehors de l'acide acétique subsistant. Négatives, de même, ont été les réactions caractérisant les acides organiques non volatils : oxalique, succinique, pyruvique, malique et citrique, qui ne paraissent même pas intervenir comme composés intermédiaires, puisque nous n'avons pu les déceler à aucun moment, bien que nos examens eussent été pratiqués au bout de un, trois, six et quinze jours.

(21) Recherches microbiologiques et biochimiques sur des bactéries muqueuses. *Thèse Pharmacie*, Paris, 1936.

La recherche des corps réducteurs s'est également montrée constamment négative, de même que celle des corps volatils : alcool, acétone (présente tout au plus à l'état de traces), aldéhyde, acétyl-méthyl-carbinol et 2-3-butylène-glycol.

Nous avons donc été amenés à envisager une attaque brutale de l'acétate avec oxydation directe sous forme de carbonates libres ou combinés. Ces derniers ont été facilement mis en évidence, et leur dosage montre qu'ils correspondent à 25/100 du carbone primitif. Quant à l'acide carbonique libre il représente 42/100 de ce carbone. Le total des carbonates permet donc de retrouver 69/100 du carbone dont 18/100, nous l'avons vu, subsistent sous la forme d'acétate non consommé. Il reste donc 13/100 du carbone non retrouvé ; une partie a été utilisée par la synthèse des corps microbiens, et nous avons pensé qu'une autre portion pouvait par analyse de gaz être décelée à l'état de *méthane*. Cette hypothèse s'est trouvée confirmée par des recherches eudiométriques qui ont montré la présence de ce corps en faible proportion.

L'ACIDE CITRIQUE, SOURCE DE CARBONE. — C'est là une épreuve classique depuis les travaux de Koser (1924-1926) qui a mis en évidence la valeur différentielle de ce test pour la distinction entre les germes du groupe *Aerogenes* qui peuvent utiliser les citrates comme source unique de carbone, et les *Escherichia* qui en sont incapables. Nos recherches ont confirmé cette donnée, aujourd'hui bien établie. Tous nos échantillons, à l'exception des n<sup>os</sup> 439 (ozène) et 1926 (Rhinosclérome), nous ont fourni des cultures abondantes par repiquages en série sur le milieu suivant, formule originale de Koser :

|                                 |                |
|---------------------------------|----------------|
| Chlorure de sodium. . . . .     | 3              |
| Sulfate de magnésie. . . . .    | 0,2            |
| Phosphate de potassium. . . . . | 1              |
| Phosphate d'ammoniaque. . . . . | 1              |
| Citrate de soude. . . . .       | 2,77           |
| Eau bi-distillée . . . . .      | Q. S. p. 1.000 |

Cette solution, amenée par addition d'une très petite quantité de soude au pH 7,5, était filtrée, répartie par fractions de 20 centimètres cubes en petites fioles d'Erlenmeyer, puis stérilisée par chauffage et ensemencée à partir de cultures sur gélose.

Eprouvés dans des conditions analogues sur ce même milieu, une série de colibacilles authentiques n'ont présenté aucun développement appréciable. L'addition de gélose à ce milieu liquide permet de préparer des boîtes pouvant servir à la mise en évidence et à l'isolement des germes du groupe *Aerogenes* dans les eaux, le lait, le beurre, ou dans certains produits pathologiques (selles, urines), ces bactéries donnant naissance à des colonies plus ou moins nombreuses, à l'exclusion du colibacille qui ne peut se développer.

D'autres sels organiques, lactates, succinates en particulier, peuvent également être utilisés comme source de carbone et fournissent des cultures très abondantes, mais ils ne présentent ni l'intérêt des acétates au point de vue de l'étude du bilan carboné, ni le caractère différentiel des citrates puisque le colibacille est également capable de les utiliser.

Certains *acides aminés*, dont nous avons parlé à propos de la nutrition azotée, peuvent également fournir aux bacilles du groupe *Aerogenes* le carbone dont ils ont besoin et permettent avec addition de phosphates et de la constante saline d'obtenir des milieux de culture favorables. Par contre, si l'*urée* constitue, comme nous l'avons vu, un excellent aliment azoté, elle est incapable d'être utilisée comme source de carbone.

**L'ALCOOL ÉTHYLIQUE SOURCE DE CARBONE.** — Bien rares sont, en dehors des ferments acétiques, les bactéries capables de se développer en utilisant comme source unique de carbone l'alcool éthylique. Un certain nombre de nos échantillons ont pu se multiplier et fournir des récoltes abondantes dans de tels milieux ; il se produit une acidification très nette, correspondant vraisemblablement à la production d'acide acétique. Des recherches en cours éclairciront ce point, ainsi que les possibilités d'utilisation d'autres alcools, en particulier l'alcool méthylique considéré, d'une façon générale, comme plus toxique et plus « antiseptique » que l'alcool éthylique.

**FERMENTATION DE L'INOSITE.** — De l'alcool éthylique, nous pouvons rapprocher l'inosite, polyalcool dont la fermentation caractériserait pour certains auteurs le groupe *Aerogenes*, à l'exclusion du colibacille et du *Bacillus acidilactici* (Hueppe).



Nous avons soumis nos souches à cette épreuve, non plus en milieu synthétique, mais en milieu peptoné (eau peptonée à 2/1.000 additionnée de 5/1.000 d'inosite). Nos échantillons de *Pneumobacille*, de *Lactis aerogenes* et de *Bacillus mucosus capsulatus* typiques nous ont donné une acidification nette ; il n'en fut pas de même des souches atypiques, en particulier des germes présentant les caractères aberrants que nous avons signalés plus haut, mobilité passagère et pouvoir gélatinolytique tardif.

**NOIRCISSEMENT DE L'ESCULINE.** — L'esculine, glucoside extrait du marron d'Inde, sous l'action de certains ferments (émulsine) se dédouble en glucose et esculétine-diphénol complexe qui, en présence de citrate ferrique, produit une coloration brune ou noirâtre suivant la réaction du milieu. Ce furent Harrison et Van der Leek qui, les premiers en 1908, étudièrent l'action de certains germes sur ce glucoside, en les ensemençant en bouillon esculiné additionné de sels biliaries. En 1912, Lahnis utilise un milieu esculiné citraté pour déceler dans le lait le colibacille qui produisait un noircissement très net.

En France, Rochaix (22), puis Rochaix et Sarda (23), étudièrent l'action des germes intestinaux sur une gélose esculinée préparée comme suit :

On fait bouillir jusqu'à dissolution dans un litre d'eau :

|  |     |
|--|-----|
| Peptone de Witte, en grammes . . . . . | 40  |
| Sels biliaries, en grammes. . . . .    | 2,5 |
| Gélose, en grammes. . . . .            | 45  |

On neutralise, refroidit au-dessous de 60°, ajoute deux blancs d'œufs, porte à l'ébullition ; dès que l'albumine est coagulée on neutralise et filtre, puis ajoute :

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| Esculine, en gramme. . . . .        | 1 |
| Citrate de fer, en gramme . . . . . | 1 |

Ce milieu réparti dans des tubes à essai est stérilisé, puis on y pratique les ensemencements par piqûres le long de la paroi du verre. Une

(22) ROCHAIX (A.). Milieu à l'esculine et colibacille. *C. R. Soc. de Biol.*, 84, 1923, p. 1042-1044.

(23) ROCHAIX et SARDA. A propos de l'action des germes intestinaux sur la gélose à l'esculine. *C. R. Soc. de Biol.*, 120, 1935, p. 217-219.

réaction positive se traduit par un noircissement des stries. Les résultats sont notés au bout de huit heures et de vingt-quatre heures d'étuve.

Dans ces conditions, les auteurs ont obtenu, avec 9 souches de pneumobacille, 7 réactions positives ; les colibacilles, au contraire, donnent en général un résultat négatif.

James, Crosnier et Morel (24), utilisent un milieu dépourvu de sels biliaires. Avec 12 pneumobacilles, le noircissement a été obtenu douze fois.

Nous avons cherché à contrôler ce résultat à l'aide de tubes obligeamment mis à notre disposition par M. James. 44 germes ont été éprouvés. 26 d'entre eux ont produit le noircissement en huit heures et 32 en vingt-quatre heures. Nous devons noter que parmi les 12 souches microbiennes ne dédoublant pas l'esculine, nous retrouvons d'abord les 5 bacilles muqueux atypiques, mobiles en culture jeune, et tardivement protéolytiques signalés précédemment, puis le bacille de l'ozène et deux germes Ladouff. et Brun. qui se présentent également comme aberrants par certains caractères. En somme sur 36 bacilles muqueux classables : 32 noircissent l'esculine, soit 90 p. 100. Cette épreuve, sans présenter une spécificité absolue, nous apparaît donc comme un bon élément de diagnostic, étant donné que nos contrôles pratiqués avec des colibacilles sont restés négatifs. Si nous comparons les résultats de cette réaction avec ceux qu'avait fournis la recherche de la fermentation de l'inosite, nous sommes frappés par leur coïncidence. Il semble que ces deux actions soient dues, sinon à la même diastase, du moins à des diastases très voisines.

#### PRODUCTION D'ACÉTYL-MÉTHYL-CARBINOL PAR OXYDATION DES SUCRES.

C'est une réaction particulièrement importante, car elle fournit un test différentiel permettant de distinguer les germes du groupe *Klebsiella* de la famille des *Escherichia*. On la désigne couramment sous le nom d'épreuve de Voges-

(24) JAMES, CROSNIER et MOREL. Action des germes intestinaux sur la gélose à l'esculine. *C. R. Soc. de Biol.*, **19**, 1935, p. 849-850.

Proskauer. Ce sont ces auteurs en effet qui, dès 1898, indiquaient une réaction colorée permettant cette distinction. En 1901, Grimbert notait la production par le *Bacillus tartricus* d'acétyl-méthyl-carbinol, qu'il identifiait par son ozazone ( $\text{CH}^3\text{-CH-OH-CO-CH}^3$ ).

Harden et Walpole, en 1906, étudiant comparativement la fermentation du glucose par le colibacille et le *Bacterium lactis aerogenes* en milieu peptoné, trouvèrent dans la culture de cette dernière famille microbienne de l'acétyl-méthyl-carbinol et même du 2-3-butylène-glycol. Harden établit ensuite que la réaction décrite par Voges et Proskauer était liée à la formation de ces corps.

D'assez nombreux procédés de recherche ont été proposés (25) ; nous avons adopté, d'une façon courante, la technique suivante proposée par O'Meara (26), en 1931.

On utilise pour les cultures un milieu ainsi composé :

|  |                |
|--|----------------|
| Chlorure de sodium, en grammes . . . . . | 5              |
| Phosphate bipoatssique . . . . .         | 1              |
| Phosphate biammonique . . . . .          | 1              |
| Sulfate de magnésium . . . . .           | 0,2            |
| Acide fumarique . . . . .                | 7              |
| Glucose . . . . .                        | 5              |
| Citrate de soude . . . . .               | 2,77           |
| Eau bi-distillée (cent. cubes). . . . .  | Q. S. p. 1.000 |

Le pH est amené à 7,5 par addition de soude et après répartition par fractions de 20 centimètres cubes en fioles d'Erlenmeyer, on stérilise à 110° pendant vingt minutes. Onensemence, comme dans les épreuves précédentes à partir de cultures fraîches sur gélose.

Le milieu riche en éléments nutritifs permet une croissance abondante des bactéries. Toutes nos souches s'y développent rapidement. Employant la technique d'O'Meara, nous avons ajouté à des cultures de vingt-quatre heures environ 0 gr. 20 de créatine et 1 cent. cube de lessive de soude. Après avoir vivement agité pendant cinq minutes, on voit le liquide

(25) DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et CHU (T. H.). Sur quelques techniques d'isolement et d'identification des microbes des eaux. *Revue d'hygiène*, **53**, 1931, p. 241-257.

(26) O'MEARA (K. A.). A simple, delicate and rapid method of detecting the formation of acetyl-methyl-carbinol by Bacteria fermenting carbonhydrates. *J. of Path.*, **34**, 1931, p. 401-406.



prendre une teinte rose vif ou rouge très nette, ne permettant aucune erreur d'interprétation. La réaction peut également être effectuée au bout de quarante-huit heures, et parfois se montre positive dans ces conditions, alors que la production d'acétyl-méthyl-carbinol n'avait pu être mise en évidence après vingt-quatre heures d'incubation. Le rôle des différents constituants du milieu paraît assez simple à définir ; c'est aux dépens du glucose que se forme, par oxydation, l'acétyl-méthyl-carbinol, le citrate de soude semble agir comme tampon et corriger l'acidification déterminée par l'action de la bactérie ; quant à l'acide fumarique, il agirait comme accepteur d'hydrogène favorisant les phénomènes d'oxydation. Ce qui nous paraît certain, c'est qu'en opérant dans les mêmes conditions, mais avec un milieu dépourvu de cette substance, nous avons obtenu des réactions beaucoup moins nettes, se traduisant par une coloration rose pâle et fugace. Sur 40 souches éprouvées, 6 nous donnèrent une réaction négative, même après un temps d'incubation porté à quarante-huit heures, ce sont les échantillons 1926 (bacille du rhinosclérome) Brun et N, germes provenant de mucus nasal et quelque peu atypique, Lad. et Lay qui se comportent par ailleurs comme des pneumobacilles authentiques.

Nous avons été ainsi amenés à rechercher une technique de détection plus sensible et nous avons eu recours à la méthode mise au point par Lemoigne et Monguillon (27) en 1930 ; ces auteurs précipitent l'acétyl-méthyl-carbinol, oxydé préalablement en diacétyle, par le perchlorure de fer, à l'état de nickel-di-méthyl-glyoxine. Chaque souche avait étéensemencée dans un litre du milieu suivant :

|   |       |
|---|-------|
| Bouillon de haricot à 70 grammes par litre. . . . . | 1.000 |
| Peptone Chapoteaut . . . . .                        | 10    |
| Glucose . . . . .                                   | 20    |

Stérilisé à 110° pendant vingt minutes.

Incubation de six jours à l'étuve.

La recherche de l'acétyl-méthyl-carbinol, pratiquée dans

(27) LEMOIGNE (M.) et MONGUILLON (P.). Présence de l'acétyl-méthyl-carbinol et du 2-3-buthylène-glycol dans le sang des animaux supérieurs. *C. R. Acad. des Sc.*, **191**, 1930, p. 80-82.

ces conditions, s'y est montrée nettement positive avec les souches pour lesquelles l'épreuve de O'Meara n'avait fourni qu'un résultat négatif. Mais voulant contrôler cette méthode, extrêmement sensible, au point de vue de sa valeur comme épreuve différentielle, nous avons procédé de façon identique avec 5 souches de colibacilles typiques, provenant de la collection de l'Institut Pasteur, et dont les caractères, soigneusement vérifiés, ne laissent place à aucun doute quant à leur classification dans le groupe des *Escherichia*. 4 de ces 5 échantillons nous ont fourni, dans les conditions expérimentales relatées plus haut, des quantités d'acétyl-méthyl-carbinol faibles mais dosables. Ajoutons que pour ces colibacilles, de même que pour nos germes muqueux, la recherche du 2-3-butylène-glycol fut négative.

De nos expériences, il ressort donc que des bactéries du groupe colibacille peuvent fournir de l'acétyl-méthyl-carbinol en petite quantité au même titre que certaines souches atypiques se rattachant nettement au genre *Aerobacter*. Pour baser sur cette production une épreuve différentielle valable, il faut utiliser une technique qui mette en évidence des quantités relativement importantes de cette substance. Le procédé décrit par O'Meara nous semble particulièrement recommandable en raison de sa simplicité et de sa netteté.

#### FERMENTATION DES SUCRES.

Ces épreuves, pratiquées systématiquement dans des tubes à cloche en eau faiblement peptonée (5/1.000) additionnée de l'hydrate de carbone à éprouver, nous ont permis, complétées par le test de la réduction du rouge neutre en milieu glucosé, de classer nos différentes bactéries muqueuses dans les sous-familles que comporte le groupe des *Klebsiella*. De nos échantillons, la plupart apparaissent comme typiques, répondant à la description classique d'une variété microbienne déterminée : les autres, au contraire, se présentent comme plus ou moins atypiques.

Les résultats rapportés dans le tableau ci-joint montrent que 8 de nos souches répondaient à la définition du Pneumobacille authentique fermentant les sucres, y compris la dulcite, avec

TABLEAU 1.

| DÉSIGNATION       | ORIGINE             | ÉPREUVES<br>de Koser | ÉPREUVES<br>de Vosges<br>Proskauer | NOIRCISSMENT<br>de l'esculine | FERMENTATION<br>de l'inosite | RÉDUCTION<br>des nitrates |       |
|-------------------|---------------------|----------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------|
|                   |                     |                      |                                    |                               |                              | Nitrites                  | Azote |
| 1 . . . . .       | Urine.              | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | L     |
| 2 . . . . .       | Urine.              | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | L     |
| 2074 . . . . .    | Collection Aitoff.  | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 2926 . . . . .    | Collection Aitoff.  | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Denf. . . . .     | Institut Pasteur.   | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | L     |
| 3279 . . . . .    | Institut Pasteur.   | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 2794 . . . . .    | Institut Lister.    | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| S2. . . . .       | Cobaye.             | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| S3. . . . .       | Cobaye.             | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| S4. . . . .       | Cobaye.             | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| S6. . . . .       | Cobaye.             | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| S7. . . . .       | Cobaye.             | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| L24 . . . . .     | Lait.               | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Beauv. . . . .    | Urine.              | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 2401 . . . . .    | Collection Aitoff.  | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Gran. . . . .     | Granulome inguinal. | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 99 . . . . .      | Institut Lister.    | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 1642 . . . . .    | Collection Aitoff.  | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 4140 . . . . .    | Institut Lister.    | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 720 . . . . .     | Collection Aitoff.  | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 2180 . . . . .    | Collection Aitoff.  | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 1684 . . . . .    | Collection Aitoff.  | +                    | +                                  | —                             | —                            | +                         | —     |
| SP. . . . .       | Institut Pasteur.   | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 516 . . . . .     | Collection Aitoff.  | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 4474 . . . . .    | Institut Lister.    | +                    | +                                  | —                             | —                            | +                         | —     |
| P.L. . . . .      | Institut Pasteur.   | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Guimb. . . . .    | Cholécystite.       | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Rémy . . . . .    | Urine.              | +                    | +                                  | —                             | —                            | +                         | —     |
| 243 . . . . .     | Institut Lister.    | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 418 . . . . .     | Institut Lister.    | +                    | +                                  | +                             | +                            | —                         | +     |
| Lor. . . . .      | Urine.              | +                    | —                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Chal. . . . .     | Institut Pasteur.   | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Berth. . . . .    | Mastoidite.         | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| 1438 . . . . .    | Collection Aitoff.  | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Langl. . . . .    | Ostéite.            | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Ver. . . . .      | Abcès pulmonaire.   | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| Bourd. . . . .    | Conjonctivite.      | +                    | +                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| N. . . . .        | Mucus nasal.        | +                    | —                                  | +                             | +                            | +                         | —     |
| P. P. 4 . . . . . | Lait.               | +                    | +                                  | —                             | —                            | +                         | —     |
| 1926 . . . . .    | Rhinosclérome.      | —                    | —                                  | +                             | +                            | +                         | —     |

L, Léger dégagement gazeux.

production généralement abondante de gaz et donnant une réduction marquée du rouge neutre en milieu glucosé. Un autre groupe, composé de 18 échantillons, ne se distingue du précédent que par l'absence de fermentation de la dulcité; ces germes rentrent donc dans le cadre du *Bacterium lactis aeroge-*



nes. Une troisième variété, voisine encore de ces deux premières, s'en écarte par la non-fermentation du lactose et de la glycérine; les 6 échantillons qui se comportent ainsi peuvent être rapprochés du bacille décrit par Frankland (1898).

Viennent ensuite 5 souches identifiables au *Bacillus mucosus capsulatus* de Fashing (1890). Ces germes se différencient très nettement des précédents par l'absence de production de gaz dans les milieux sucrés. Les échantillons appartenant à cette variété que nous avons eu l'occasion d'étudier se sont montrés particulièrement muqueux et la consistance glaireuse de leurs colonies était très accusée. 4 souches, enfin, tout à fait atypiques, n'ont pu être classées.

Parmi les hydrates de carbone éprouvés pour ces réactions de fermentation, deux paraissent présenter un intérêt spécial, ce sont le saccharose et le lactose.

La fermentation du *saccharose* a été donnée comme un test différentiel permettant de distinguer les *Klebsiella* véritables du *Bacillus acidi lactici* (Hueppe) : ce dernier germe ne produit pas d'acidification en milieu saccharosé. Si nous nous en rapportons à nos résultats personnels, nous voyons que sur 40 échantillons 37 ont nettement viré le milieu, les seuls bacilles faisant exception ont été ceux qui se présentent comme les plus atypiques.

La fermentation du *lactose* a été, elle aussi, considérée comme caractérisant le *Pneumobacille* ; cette propriété opposerait la famille des *Coli-Aerogenes* à celles des bacilles typho-paratyphiques.

L'épreuve se pratiquait par ensemencement sur gélose lactosée tournesolée, où les germes du premier groupe donnent des colonies rouges et les autres des colonies bleues. Mais le test ainsi réalisé est assez grossier et les indications qu'il fournit sont sujettes à caution. En effet, si les colibacilles produisent, en général, un virage franc et persistant, les bactéries muqueuses, au contraire, comme nous avons pu le vérifier, ne virent pas ou ne déterminent qu'un virage passager suivi d'un retour rapide à la teinte neutre ou alcaline (caméléonage).

L'ensemencement en tubes à cloche nous a permis de distinguer parmi nos souches celles qui fermentent le lactose avec production de gaz (23 échantillons), celles qui simplement aci-

TABLEAU II.

| ÉCHANTILLONS | GLUCOSE |   | LÉVULOSE |   | MALTOSE |   | MANNITE |   | SACCHAROSE |   | LACTOSE |   | GLYCÉRINE |   | DULCITE |   |
|--------------|---------|---|----------|---|---------|---|---------|---|------------|---|---------|---|-----------|---|---------|---|
|              | A       | G | A        | G | A       | G | A       | G | A          | G | A       | G | A         | G | A       | G |
| 1            | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 2            | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 2074         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 2926         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| Denf.        | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 3279         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 2794         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| S2           | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| S3           | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| S4           | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| S6           | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| S7           | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| L24          | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| Beauv.       | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 2401         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| Gran.        | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 99           | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 1642         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 4140         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 720          | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 2180         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| 1684         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |
| S. P.        | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | ±       | — | —         | — | —       | — |
| 516          | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | ±       | — | —         | — | —       | — |
| 4474         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | —       | + | —         | — | +       | + |
| P. L.        | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | —       | — | —         | — | —       | — |
| Guimb.       | +       | + | +        | + | +       | + | +       | — | +          | + | —       | — | —         | — | —       | — |
| Rémy.        | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | — | —       | — | —         | — | —       | — |
| 243          | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | — | —       | — | —         | — | —       | — |
| 418          | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | — | —       | — | —         | — | —       | — |
| Lor.         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | — | —       | — | —         | — | —       | — |
| Chal.        | +       | + | +        | — | +       | — | +       | — | +          | — | ±       | — | —         | — | —       | — |
| Berth.       | +       | — | +        | — | +       | — | +       | — | +          | — | —       | — | —         | — | —       | — |
| 1458         | +       | — | +        | — | +       | — | +       | — | +          | — | ±       | — | —         | — | —       | — |
| Langl.       | +       | — | +        | — | +       | — | +       | — | +          | — | ±       | — | —         | — | —       | — |
| Ver.         | +       | — | +        | — | +       | — | +       | — | +          | — | —       | — | —         | — | —       | — |
| Bourd.       | +       | — | +        | — | +       | — | +       | — | +          | — | —       | — | —         | — | —       | — |
| N.           | +       | — | +        | — | +       | — | +       | — | —          | — | ±       | — | +         | — | —       | — |
| P. P. 4.     | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | —          | — | +       | + | +         | + | —       | — |
| 1926         | +       | + | +        | + | +       | + | +       | + | +          | + | +       | + | +         | + | +       | + |

difient le milieu (10 échantillons), et celles qui sont dépourvues d'action acidifiante (7 échantillons). D'autre part, l'ensemencement dans un milieu synthétique comprenant du lactose comme source unique de carbone montre si le bacille est capable d'assimiler cet hydrocarbure, ce qui a été le cas de presque tous nos échantillons. La mesure des variations journalières du pH dans un tel milieu à mesure que la culture se

développe permet de suivre le processus d'acidification plus ou moins prononcée suivant les échantillons.

D'autres épreuves plus complexes se rattachent à la fermentation du lactose, mais leurs résultats ne concordent pas toujours avec les précédents et sont d'interprétation difficile (coagulation du lait, virage du petit-lait tournesolé).

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Nos observations personnelles confirment l'impression ressentie à la lecture de nombreux travaux consacrés à l'étude des bacilles muqueux (28). Ces bactéries forment un groupe hétérogène dont certains échantillons se présentent comme répondant aux types des diverses variétés classiques; d'autres, au contraire, s'éloignent de ces descriptions et se montrent atypiques à tel ou tel égard. En outre, le problème de la classification se trouve compliqué par la mutabilité de ces germes. Il conviendrait, sans doute, de leur appliquer d'une part les procédés d'isolement à partir d'une plastide unique, utilisés en particulier au laboratoire du professeur Lasseur, d'autre part, les techniques de conservation dérivant des recherches de Sordelli et sur lesquelles plusieurs communications au II<sup>e</sup> Congrès international des Microbiologistes (Londres, juillet 1936), entre autres celle de St. John Brooks et M. Rhodes (29) ont rappelé récemment l'attention.

Les *caractères généraux* de ces bactéries sont, dans l'ensemble, assez semblables d'un échantillon à l'autre, en rapport avec la production abondante de la substance gommeuse péri-microbienne. On note cependant des aspects singuliers de certaines souches : c'est ainsi que nous avons pu décrire et figurer deux germes dont les *dimensions* s'écartaient nettement des chiffres moyens fournis par les classiques; l'un de ces microbes présentait une apparence *cocciforme*, l'autre se montrait *filamenteux*. Nous avons également mis en évidence et figuré

(28) En particulier KLIEWE (H.) et HSU (M.). Studien über Friedländer Bazillen und anderen Kapselbakterien. *Ztschrift für Immunitäts.*, 86, 1935, p. 481-500.

(29) BROOKS (St. R. John) et RHODES (M.). *Some useful media for the preservation of stock cultures.*

la *chromatophilie bipolaire* des germes dans les cultures, ainsi que l'aspect *capsulé* qu'ils peuvent revêtir en milieu usuel non albumineux. Nous avons, enfin, démontré l'existence, chez un certain nombre de ces bacilles, d'une phase assez courte de *mobilité* déjà signalée par G. S. WILSON (30), liée à la présence de cils. La coexistence chez certaines de ces souches d'un pouvoir gélatinolytique faible et tardif, mais net, permet de les rapprocher du *Bacillus cloacae* de Jordan. D'autres échantillons, au contraire, sont dépourvus de toute action liquéfiante sur la gélatine.

Les recherches de *métabolisme bactérien* appliquées à cette famille des bacilles muqueux ont apporté déjà des résultats fort intéressants. L'étude de la nutrition azotée dénote un pouvoir de synthèse prononcé puisqu'on obtient des récoltes abondantes à partir des sels ammoniacaux. Nous avons montré que l'urée, et, d'autre part, un bon nombre d'acides aminés, peuvent aussi servir de source d'azote, certains de ces derniers corps étant capables aussi de fournir le carbone nécessaire au développement des germes, ce qui n'est pas le cas de l'urée. La nutrition carbonée de ces bactéries a également donné lieu à un grand nombre de travaux. Pour notre part, nous nous sommes attachés à l'étude du développement dans un milieu synthétique où la source unique de carbone était constituée par l'acide acétique. 22 de nos souches sur 40 ont pu se développer dans un tel milieu et les analyses pratiquées sur l'un de ces échantillons nous ont montré qu'il se produit une oxydation de l'acide acétique avec formation de carbonates dissous, d'acide carbonique libre et de petites quantités de méthane, sans qu'on puisse mettre en évidence de produits intermédiaires, acides organiques volatils ou non volatils, substances réductrices, cétones, etc... Nous avons étudié également la croissance d'un certain nombre de nos bacilles dans des milieux où l'aliment carboné se trouve constitué par l'alcool éthylique. On obtient avec ces souches une récolte abondante, le milieu présentant une acidification marquée, due vraisemblablement à la production d'acide acétique.

Parmi les épreuves proposées pour différencier les *Kleb-*

(30) G. S. WILSON, *The bacteriological grading of milk*. Londres, 1935, p. 156.



*siella* des *Escherichia*, le test de Koser (développement en milieu citraté), la production d'acétyl-méthyl-carbinol mise en évidence par la technique d'O'Meara, la formation du clou dans la gélatine ensemencée par piqûre nous ont paru les plus probantes. Le noircissement de l'esculine a été obtenu avec 75 p. 100 de nos échantillons muqueux, coïncidant avec la fermentation de l'inosite. L'acidification des milieux saccharosés s'est produite dans 92 p. 100 des cas.

Quant à la répartition de nos germes dans les diverses sous-familles du groupe des *Klebsiella*, les épreuves des fermentations en tubes à cloche nous ont permis de distinguer 7 *Pneumobacilles* typiques, 18 *Lactis aerogenes*, 6 bacilles de Frankland, 5 du type *Mucosus capsulatus*, et 4 bacilles atypiques.

Ces recherches valent, nous semble-t-il, d'être poursuivies : dès à présent elles nous ont permis, croyons-nous, d'ajouter quelques données nouvelles à la masse des faits déjà accumulés par les nombreux chercheurs que tente l'étude de cette famille microbienne. Si frappante par la netteté de ses caractères dans les types purs, elle est, par contre, mal délimitée dans ses contours, par suite de l'existence de souches intermédiaires la rattachant insensiblement aux groupes des *Escherichia* et des *Proteus*, comme aussi en raison de la mutabilité des bactéries qui la composent.

**EXTENSION DE TECHNIQUES  
EMPLOYÉES EN PATHOLOGIE ANIMALE  
A L'ÉTUDE DES RÉACTIONS DE LA CELLULE VÉGÉTALE  
A CERTAINES INFECTIONS**

par THÉRÈSE FRÉMONT.

Le but de ce travail a été d'étudier les réactions de la cellule végétale parasitée à la lumière des connaissances acquises dans le domaine de l'immunologie animale.

La connaissance des mécanismes de résistance de la cellule végétale, longtemps réduite à des données morphologiques et anatomiques, pouvait bénéficier, nous semblait-il, de l'application méthodique des techniques employées journellement en pathologie humaine.

Les résultats de nos expériences nous ont conduite, comme on le verra, à rapprocher beaucoup de manifestations de résistance de la cellule végétale, de phénomènes déjà connus en pathologie animale. Ils nous permettent de conclure à des analogies très grandes, en dépit des apparences, entre le comportement de la cellule animale et celui de la cellule végétale.

Et l'intérêt de constater l'unité des manifestations du monde biologique n'a pas été un des moindres mobiles qui nous ait guidée dans ce travail.

**I. — RECHERCHE ET MISE EN ÉVIDENCE  
DES FACTEURS HUMORAUX DE L'IMMUNITÉ**

Nous diviserons notre travail de la façon suivante :

Dans une première partie A), nous étudierons les réactions de plantes inoculées ou infectées avec des cultures bactériennes totales.

Dans une seconde partie B), nous étudierons les réactions

de plantes vis-à-vis de toxines bactériennes obtenues par filtration des mêmes cultures.

Dans une troisième partie C), nous exposerons le résultat d'une expérience au cours de laquelle nous avons remplacé les protéines microbiennes par de l'albumine d'œuf.

Enfin, dans une dernière partie, nous étudierons deux cas de mise en œuvre des mécanismes de défense de la plante : le cas de l'altération d'un germe non pathogène au cours de son séjour dans une plante, et celui de la défense des épidermes végétaux.

#### A. — Étude des réactions de plantes inoculées ou infectées avec des cultures bactériennes.

### PRÉPARATION DU MATÉRIEL D'EXPÉRIENCE

#### CHOIX DU MATÉRIEL D'EXPÉRIENCE.

Le choix du matériel d'expérience a présenté pour notre travail d'assez grandes difficultés.

Les conditions défectueuses dans lesquelles nous étions au départ de notre travail pour cultiver des plantes restreignaient beaucoup les limites de notre choix. Nous ne pouvions utiliser que les plantes d'entretien et de production faciles : plantes à tubercules (*Solanum tuberosum*), à bulbes (*Allium cepa*), plantes issues de graines pourvues de réserves abondantes (*Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*).

L'emploi des techniques sérologiques que nous désirions faire dans cette expérience nous interdisait, au moins en partie, l'emploi de champignons comme agents parasitaires. Nous nous sommes donc toujours adressée à des bactéries. D'autre part, peu nous importait que l'agent fût pathogène ou non à la plante d'expérience. Notre choix a d'abord porté sur le *B. proteus*, de culture et d'identification faciles. Postérieurement, l'emploi du cobaye pour la mise en évidence des anticorps végétaux nous a conduit à nous adresser à d'autres microbes pathogènes pour cet animal, le bacille de Gartner par exemple. Dans ces conditions, l'étude de cas naturels d'in-

fections n'occupe qu'une très faible place dans notre travail, bien que nous ayons l'intention d'étudier plus spécialement, à l'avenir, la formation et la mise en évidence des anticorps chez les plantes au cours des maladies parasitaires connues en pathologie végétale.

### INOCULATION DU MATÉRIEL.

Sauf dans le cas où nous nous sommes adressée à des végétaux naturellement infectés par une bactérie, l'expérience nous a montré qu'il fallait, pour étudier les réactions des plantes à des bactéries qui n'exercent sur elles aucune action pathogène dans les conditions ordinaires, leur inoculer des doses de cultures microbiennes relativement élevées.

L'inoculation d'une suspension ou solution quelconque à une plante est difficile à réaliser du fait qu'il n'existe chez elle rien de comparable au système circulatoire des animaux. Si l'on fait une plaie dans un organe végétal quelconque, et que l'on amène la suspension à inoculer au contact de cette plaie, les cellules périphériques, qui bientôt se cicatriseront, sont seules en contact avec elle. Si la plante absorbe un peu de ce liquide, les cellules intérieures ne la reçoivent qu'après sa filtration et sa modification possible à travers les membranes protoplasmiques.

Les cellules des canaux parcourus par les sèves de la plante ne jouent pas elles-mêmes un rôle seulement passif. Il se fait, dans la plante, une modification rapide des solutions absorbées dès qu'elles y subissent un transport. En fait, celui-ci ne semble même possible que si la modification a lieu. Nous avons résolu de façon variable, suivant la nature de la plante sur laquelle nous travaillions, ce problème délicat de l'inoculation.

1° CAS DES LÉGUMINEUSES (*Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*).  
— Le choix de ces plantes nous a donné pleine satisfaction. d'abord parce que leur culture était facile, puis à cause de la présence d'un canal médullaire, surtout large dans le cas



de *Vicia faba*. Ce canal médullaire permet l'injection de quantités relativement élevées (1 cent. cube par exemple, dans une jeune plante de trois semaines) de n'importe quelle culture bactérienne. La culture ainsi introduite est amenée au contact des cellules vivantes du parenchyme et des vaisseaux sans traumatisme considérable de la plante.

Nous utilisons des cultures microbiennes de vingt-quatre heures en bouillon Liebig (*B. proteus* ou *B. de Gärtner*) et nous les inoculons dans les tissus au moyen d'une seringue à injection hypodermique. Nous choisissons le point d'inoculation au sommet de la tige, là où le canal médullaire commence à se former, en ayant soin de pratiquer auparavant, au bas de cette même tige, une perforation par où s'échappe l'air que la culture inoculée pousse devant elle.

Les plantes étudiées sont soumises à trois ou quatre inoculations, en général à huit jours d'intervalle. Elles sont sacrifiées un à huit jours après la dernière inoculation.

Nous donnons, dans le cas de chaque expérience, le détail du protocole suivi.

2° *Allium cepa*. — Encore plus que la Fève, l'Oignon ou l'Échalote se prêtaient à une culture facile au laboratoire. Il suffit de mettre les bulbes en terre humide ou au-dessus d'un cristalliseur rempli d'eau pour obtenir rapidement, même en lumière réduite, des plantes dans les feuilles desquelles il est facile d'inoculer des quantités relativement importantes de culture bactérienne (1 cent. cube par exemple, dans chaque feuille d'un pied d'*Allium cepa*).

Le seul inconvénient de ces plantes est la présence, dans leurs tissus, d'un principe antiseptique qui peut masquer le pouvoir de réaction de la cellule vivante ou se superposer à lui. Nous les avons néanmoins employées pour un certain nombre d'expériences.

Comme dans le cas des fèves, on inocule à la plante trois ou quatre fois de suite, à huit jours d'intervalle, une culture bactérienne (Gärtner ou Tétragène) de vingt-quatre heures en bouillon Liebig. On sacrifie la plante un à huit jours après la dernière inoculation.

3° *SOLANUM TUBEROSUM*. — C'est encore la possibilité d'obtenir facilement une plante en végétation au laboratoire, même pendant les mois d'hiver, qui nous a fait prendre la Pomme de terre.

Elle présente pourtant le double inconvénient de ne pas permettre facilement les inoculations, et d'offrir dans son bulbe une énorme masse de tissus douée de peu d'activité végétative. Il s'ensuit que les réactions de la plante seront moins étendues et moins accentuées que dans les plantes citées précédemment.

Nous avons pratiqué l'inoculation en faisant, dans le tubercule, une cavité circulaire de 1 cent. 5 de diamètre et de 3 centimètres de profondeur, avec un perce-bouchon stérilisé. C'est dans cette cavité que nous avons introduit 1 cent. cube de la culture bactérienne en bouillon, dont nous voulions étudier l'effet. Pour empêcher toute contamination, nous avons ajusté, dans la cavité, un tube de verre stérile, du diamètre de l'orifice et qui a été bouché au coton. (C'est une méthode un peu analogue à celle que Carbone appelle la méthode du « tasselo »).

Le tubercule est mis à végéter sur terre humide ou bien laissé à l'état de repos. Nous avons, en effet, voulu étudier ses réactions dans différents cas de végétation.

Nous avons répété une, deux ou trois fois l'inoculation bactérienne dans ces tubercules, en grattant chaque fois avec une aiguille lancéolée stérilisée, l'assise de liège formée après la dernière inoculation, pour remettre la culture bactérienne en contact avec des cellules vivantes.

#### EXTRACTION DU SUC CELLULAIRE.

Si l'inoculation d'une culture bactérienne à une plante présente des difficultés, le problème de l'extraction du suc cellulaire est également très délicat.

L'idéal eut été d'obtenir, par ponction d'une cellule, le suc élaboré par cette cellule au cours de sa réaction contre le parasite. Une telle pratique étant impossible, force nous a été de préparer un extrait total qui représente un mélange des

sucs vacuolaires, de composés protoplasmiques et des sèves de toutes les parties de la plante.

Nous avons employé deux méthodes :

*Première méthode* : On opère un broyage de l'organe végétal étudié, soit au pilon, dans un mortier, soit par écrasement sur plaque de verre dépoli, soit par brassage avec des billes de verre dans le broyeur de Borrel ; on ajoute au magma obtenu une certaine quantité d'eau distillée (100 cent. cubes d'eau pour 25 gr. de plante) ; on laisse macérer douze heures, puis on presse le tout dans une étamine et on filtre sur papier.

*Deuxième méthode* : On broie l'organe végétal dans un hacheur de type ordinaire muni d'un couteau très fin. On parvient ainsi à réduire la pulpe en une bouillie ou en un liquide épais, alors que les éléments ligneux de la plante restent dans le hachoir. On recueille le liquide obtenu ; on le filtre sur papier.

#### FILTRATION DES EXTRAITS VÉGÉTAUX OBTENUS.

La filtration des extraits végétaux obtenus est nécessaire pour plusieurs raisons :

1° Parce que les réactions d'agglutination et de précipitation ne peuvent s'observer qu'avec des liquides clairs.

2° Parce que, dans le cas où l'on doit opérer avec des liquides stériles (inoculation à des animaux de laboratoire, par exemple), le passage sur bougie Chamberland L3 constitue le meilleur moyen de les stériliser. Il est, de plus, commode pour une bonne organisation du travail, d'effectuer en série les extractions de sucs cellulaires, puis les réactions effectuées sur eux. Il faut donc pouvoir assurer la conservation de ces extraits pendant une période de temps plus ou moins longue. Nous avons essayé, dans ce but, plusieurs méthodes : conservation à la glacière, pasteurisation (passage à l'étuve à 55°, trois jours de suite), stérilisation par filtration sur bougie Chamberland L3. C'est cette dernière méthode que nous avons finalement jugée la meilleure, parce qu'elle est la plus sûre.

L'objection que l'on peut faire à ces filtrations est que chacune d'elles retient plus ou moins de matières colloïdales en suspension dans les extraits, et les substances actives que l'on recherche peuvent se fixer sur ces matières colloïdales.

Chaque mode de filtration fournit un liquide qui présente un aspect physique différent de celui que possède un autre filtrat. Celui obtenu par passage sur bougie L3 est différent de celui obtenu par filtration sur terre d'infusoire, qui n'est lui-même pas semblable à celui que donne la filtration sur noir animal, etc... Il y a donc des raisons de croire que la composition d'un extrait donné est modifiée selon le mode de filtration adopté.

Une de nos expériences, citée plus loin (recherche des précipitines), a conduit à une comparaison des propriétés des extraits filtrés suivant différents modes. Dans cette expérience, c'est la filtration sur noir animal qui a donné le filtrat le plus riche en précipitines. Il se peut donc que ce soit le mode qui altère le moins la composition des extraits. Pourtant, à cause de la commodité et parfois la nécessité, d'avoir des extraits stériles, c'est la filtration sur bougie Chamberland L3 que nous avons le plus fréquemment employée.

## ÉTUDE DU MATÉRIEL D'EXPÉRIENCE

### *Recherche par les méthodes sérologiques des anticorps élaborés par les plantes infectées ou inoculées avec des bactéries.*

Dans les extraits de plantes inoculées expérimentalement avec des cultures bactériennes, nous avons recherché la présence des anticorps dans le suc cellulaire, par les techniques d'agglutination, de précipitation, de déviation du complément.

## I. — RECHERCHE DES AGGLUTININES.

*Technique.* — Nous avons recherché les agglutinines de deux façons : a) soit macroscopiquement, b) soit microscopiquement.



a) **AGGLUTINATION PAR LE PROCÉDÉ MACROSCOPIQUE EN TUBE A HÉMOLYSE.** — On fait une suspension en eau physiologique, d'une culture bactérienne sur gélose de vingt-quatre heures, à la densité approximative de 500 millions de germes par centimètre cube.

On y ajoute l'extrait de plantes à des concentrations variables ( $1/5$  à  $1/100.000$  du volume total de la réaction).

Les tubes sont mis à l'étuve une heure à  $37^{\circ}$ , puis laissés vingt-quatre heures à  $20^{\circ}$ , température du laboratoire ; après quoi, la lecture est faite.

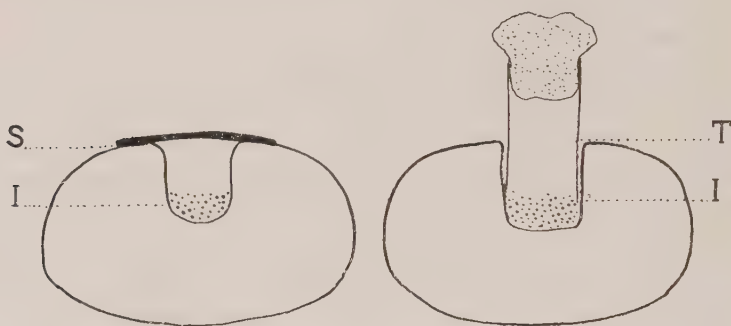


FIG. 1. — *Tubercule 1.* Inoculation dans une cavité bouchée par une bande de sparadrap. S, bande de sparadrap ; I, inoculum.

*Tubercule 2.* Inoculation dans une cavité fermée par un tube de verre stérile. T, tube de verre bouché au coton ; I, inoculum.

b) **AGGLUTINATION PAR LE PROCÉDÉ MICROSCOPIQUE.** — Le principe de la réaction est le même que dans le cas de l'agglutination macroscopique, mais le mélange des suspensions microbiennes et des extraits de plantes, fait dans des verres de montre, est examiné au microscope dans les quelques heures qui suivent la préparation. Dans le cas où se produit une agglutination, l'observateur voit se former des amas de bactéries de plus en plus gros.

Ces deux techniques ont, en principe, la même rigueur, mais il est bon, lorsqu'on a des doutes sur la nature des flocons que l'on voit se former dans la série des tubes d'agglutination, dans le cas du procédé macroscopique, de vérifier qu'il s'agit bien d'agrégats bactériens, par l'examen microscopique. Il peut, en effet, au sein de liquides organiques, se

produire des précipités colloïdaux qui peuvent faire croire à une réaction d'agglutination positive, et amener une cause d'erreur.

EXPÉRIENCE N° 1. — *Plante d'expérience : Solanum tuberosum. Germe inoculé : B. de Gärtner.*

Les inoculations ont été faites de deux façons :

1° Soit en versant 1 cent. cube de culture de vingt-quatre heures en bouillon Liebig dans une cavité creusée de façon stérile dans le tubercule, puis en recouvrant cette cavité de bandes de sparadrap fermant l'orifice ;

2° Soit en versant 1 cent. cube de la culture à inoculer dans une cavité circulaire taillée dans le bulbe avec l'emporte-pièce stérilisé, et fermée par un tube de verre stérile, bouché au coton.

L'inconvénient de la première technique est qu'elle n'assure pas la stérilité de la cavité dont on observe souvent l'envahissement par des moisissures ou germes étrangers amenant la pourriture du tubercule.

Nous avons, le même jour, utilisé 9 séries de tubercules ainsi préparés.

#### *Séries témoins.*

*Série 1.* — Tubercules de Pommes de terre inoculés avec de l'eau salée, mis en végétation pendant deux mois (une inoculation à chaque tubercule, par la méthode de la bande de sparadrap).

*Série 2.* — Tubercules inoculés avec de l'eau salée, laissés à l'état dormant pendant un mois et demi (une inoculation à chaque tubercule par la méthode du tube à essai).

*Série 3.* — Tubercules inoculés avec de l'eau salée, mis en végétation pendant un mois et demi (une inoculation à chaque tubercule par la méthode du tube à essai).

#### *Séries d'expérience.*

*Série 4.* — Tubercules inoculés avec B. de Gärtner et mis à végéter pendant deux mois (une inoculation à chaque tubercule par la méthode de la bande de sparadrap).

*Série 5.* — Tubercules inoculés avec B. de Gärtner, mis à végéter pendant deux mois (deux inoculations à chaque tubercule par la méthode de la bande de sparadrap).

*Série 6.* — Tubercules inoculés avec du B. de Gärtner,

laissés à l'état dormant pendant un mois et demi (une inoculation à chaque tubercule par la méthode du tube à essai)

**Recherche des agglutinines dans l'extrait de *Solanum tuberosum* inoculé avec du B. de Gärtner, par le procédé microscopique.**

RÉSULTATS.

| NUMÉRO DES EXTRAITS      | DILUTIONS                        |      |      |      | OBSERVATIONS               |
|--------------------------|----------------------------------|------|------|------|----------------------------|
|                          | 1/3                              | 1/10 | 1/20 | 1/50 |                            |
| N° 1. Témoin eau salée . | —                                | —    | —    | —    | Agglutination très rapide. |
| N° 2. Témoin eau salée . | +                                | —    | —    | —    |                            |
| N° 3. Témoin eau salée . | +                                | +    | —    | —    |                            |
| N° 4 . . . . .           | ++                               | +    | —    | —    |                            |
| N° 5 . . . . .           | +                                | ±    | —    | —    |                            |
| N° 6 . . . . .           | ++                               | ++   | +    | +    |                            |
| N° 7 . . . . .           | +                                | +    | +    | +    |                            |
| N° 8 . . . . .           | ++                               | ++   | +    | +    |                            |
| N° 9 . . . . .           | +                                | +    | +    | +    |                            |
| Témoin Gärtner . . . .   | Ne s'agglutine pas spontaném nt. |      |      |      |                            |

*Série 7.* — Tubercules inoculés avec du B. de Gärtner, mis à végéter pendant un mois et demi (une inoculation à chaque tubercule par la méthode du tube à essai).

*Série 8.* — Tubercules inoculés avec du B. de Gärtner, laissés à l'état dormant pendant un mois (deux inoculations à chaque tubercule par la méthode du tube à essai).

*Série 9.* — Tubercules inoculés avec du B. de Gärtner, mis à végéter pendant un mois (deux inoculations par la méthode du tube à essai).

L'extrait des plantes, obtenu après broyage au broyeur (suivant la technique 2, p. 536), a été filtré sur bougie Chamberland L3.

Il a été employé à la recherche des agglutinines par les procédés macroscopiques et microscopiques.

Les extraits végétaux ne précipitent pas.

Sur cette série d'extraits, nous avons opéré au microscope, une série de micro-agglutinations.

Pour chaque extrait, les dilutions dans la suspension de B. de Gärtner ont été faites au 1/3, au 1/10, au 1/20, au 1/50.

Après vingt minutes de contact, on examine les mélanges placés entre lame et lamelle.

Le tableau suivant donne les résultats de la micro-agglutination. Les résultats sont presque exactement ceux de l'agglutination en tubes à hémolyse.

Aucune des dilutions d'extraits de plantes ne précipite.

La lecture des deux tableaux conduit aux conclusions suivantes :

Dans le cas des mélanges présentant une concentration relativement élevée en extraits de plantes (1/10, 1/20), on observe presque toujours l'agglutination de la suspension bactérienne. Mais dans le cas des mélanges où les extraits de plantes sont plus dilués (1/50, 1/100, 1/200), l'agglutination

**Recherche des agglutinines dans l'extrait de *Solanum tuberosum* inoculé avec du B. de Gärtner, par le procédé macroscopique.**

RÉSULTATS.

| NUMÉRO DES SÉRIES                | DILUTIONS DES EXTRAITS VÉGÉTAUX |       |       |        |
|----------------------------------|---------------------------------|-------|-------|--------|
|                                  | 1/20                            | 1/100 | 1/500 | 1/1000 |
| N° 1. Témoin eau salée . . . . . | +                               | —     | —     | —      |
| N° 2. Témoin eau salée . . . . . | +                               | —     | —     | —      |
| N° 3. Témoin eau salée . . . . . | ++                              | +     | —     | —      |
| N° 4 . . . . .                   | +                               | —     | —     | —      |
| N° 5 . . . . .                   | +                               | +     | —     | —      |
| N° 6 . . . . .                   | +                               | —     | —     | —      |
| N° 7 . . . . .                   | +                               | +     | +     | —      |
| N° 8 . . . . .                   | ++                              | ++    | +     | —      |
| N° 9 . . . . .                   | ++                              | +     | +     | +      |
| Témoin Gärtner (1). . . . .      | N'agglutine pas spontanément.   |       |       |        |

(1) Aucune des dilutions d'extraits de plantes ne précipite.

n'existe que dans les tubes contenant l'extrait de plantes préparées. On ne peut pas, à ces dilutions, invoquer l'acidité pour expliquer l'agglutination, puisque la réaction est très voisine de la neutralité et qu'elle est la même dans la série d'expérience et dans la série témoin. L'agglutination produite par l'extrait de plantes inoculées semble donc bien due à une action spécifique de la plante traitée.

Remarquons, en passant, que M. Magrou observe exacte-



ment le même phénomène dans le cas de l'agglutination de *B. tumefaciens* par le suc de *Pelargonium* : les extraits de *Pelargonium* à tumeurs et ceux de *Pelargonium* sans tumeurs agglutinent les suspensions de *B. tumefaciens* aux concentrations fortes. Mais, dans le cas où les extraits sont plus dilués, seuls les extraits de *Pelargonium* atteints de tumeurs agglutinent le *B. tumefaciens*.

EXPÉRIENCE N° 2. — Plante d'expérience : *Allium cepa*. Germe inoculé : *B. Gärtner*.

On a inoculé les bulbes d'*Allium cepa* en y pratiquant, de façon stérile, des cavités circulaires à l'emporte-pièce, et en y introduisant 1 cent. cube de culture, dans chacune des 3 ou 4 incisions, pour un bulbe moyen de 40 grammes environ. On bouche ces incisions par des bandes gommées. Les bulbes sont mis en terre, entrent en croissance. Les germes d'Oignons traumatisés par l'incision dans le bulbe sont en contact direct avec la culture microbienne inoculée. Les feuilles se développent normalement, mais présentent des cicatrices de liège, marque des lésions subies par le germe.

Au bout de trois semaines de végétation environ, on arrache ces plantes : on broie dans un mortier, feuilles et bulbes (ceux-ci à l'exclusion des écailles extérieures). On ajoute 100 cent. cubes d'eau distillée à 40 grammes de tissus végétaux. On laisse macérer douze heures. Puis on presse dans une mousseline et on filtre sur papier. L'extrait ainsi obtenu est refiltré sur bougie Chamberland L3.

On opère sur ces extraits la recherche des agglutinines.

Le pH de la réaction est voisin de 7.

| EXTRAITS                        | DILUÉS DANS UNE SUSPENSION EN EAU PHYSIOLOGIQUE<br>de Gärtner au |      |      |       |       |        |
|---------------------------------|--|------|------|-------|-------|--------|
|                                 | 1/10   | 1/20 | 1/50 | 1/100 | 1/500 | 1 1000 |
| <i>Allium cepa</i> inoculé. . . | Légère agglutination.  |      |      |       | +     | +      |
| <i>Allium cepa</i> témoin. . .  | —  | —    | —    | —     | —     | —      |

Dans cette expérience, la série des réactions effectuées avec l'extrait de plantes témoins n'a donné aucune agglutination. La série des réactions effectuées avec les extraits de plantes traitées a donné une agglutination visible à toutes les dilutions, mais plus particulièrement marquée aux concentrations

faibles. Nous avons souvent remarqué ce fait : agglutination faible ou nulle aux concentrations fortes, agglutination forte aux concentrations faibles. Ceci ne se produit d'ailleurs que dans le cas où les extraits de plantes témoins ne donnent aucune agglutination. Dans cette réaction, comme dans celles précédemment effectuées avec l'extrait de *Solanum tuberosum*, les tubes marquant l'action spécifique de l'extrait de plantes traitées sont donc ceux où le suc de la plante est relativement dilué.

EXPÉRIENCE N° 3. — *Plante d'expérience* : Échalote, croissant en eau distillée, préparée suivant la technique indiquée p. 536.

*Microbe inoculé à cette plante* : Tétragène.

Trois inoculations à huit jours d'intervalle, 0 c. c. 25 dans chaque feuille à chaque inoculation.

Extraction du suc cellulaire par broyage suivi de macération ; cette extraction est suivie de filtration sur bourre d'amiante, puis sur bougie L3. Les feuilles seules ont été utilisées.

La réaction est faite sur l'extrait de plantes préparées avec le Tétragène et sur de l'extrait d'Échalote inoculée avec de l'eau salée qui servira de témoin.

*Résultat de l'expérience :*

| NATURE DE L'EXTRAIT                                | DILUTIONS |      |      |       |
|--|-----------|------|------|-------|
|  | 1/10      | 1/20 | 1/50 | 1/100 |
| Extrait de plantes préparées . . . . .             | --        | —    | —    | +     |
| Extrait de plantes inoculées avec de l'eau salée . | —         | —    | —    | —     |

Nous avons, dans cette série d'expériences, opéré également la réaction avec des suspensions de germes autres que le Tétragène (*B. de Gärtner*, *B. proteus*, *B. coli*). Nous n'avons, dans ces cas, obtenu aucune agglutination avec l'extrait de plantes normales ou préparées.

Cette expérience présente un résultat analogue à celui donné par l'expérience précédente :

Pas d'agglutination dans les tubes de la série témoin.

Agglutination dans le dernier tube de la série d'expérience.

La propriété agglutinante spécifique de l'extrait de plantes

traitées ne se manifeste donc encore qu'à des concentrations faibles.

Ce phénomène peut être rapproché du phénomène de « zone » connu en sérologie. Un sérum possédant la propriété d'agglutiner une bactérie donnée ne manifeste cette propriété que dans une certaine zone de l'échelle des dilutions. Cette zone ne coïncide pas forcément avec celle des concentrations fortes.

EXPÉRIENCE N° 4. — Dans cette expérience, nous avons recherché les agglutinines, non plus dans des plantes préparées par des inoculations avec un germe déterminé, mais dans des plantes croissant dans un milieu additionné de cultures d'un germe donné.

Dans ce but, des tubercules d'*Allium cepa* sont mis à croître à la surface de milieux liquides de compositions variables :

- 1° Eau distillée ;
- 2° Eau salée ;
- 3° Bouillon Liebig ;
- 4° Eau distillée additionnée de 1 cent. cube de culture en bouillon de vingt-quatre heures de *B. proteus*, pour 50 cent. cubes d'eau ;
- 5° Eau salée additionnée de 1 cent. cube de culture en bouillon de vingt-quatre heures de *B. proteus*, pour 50 cent. cubes d'eau ;
- 6° Bouillon Liebig additionné de 1 cent. cube de culture en bouillon de vingt-quatre heures de *B. proteus*, pour 50 cent. cubes d'eau.

La durée de l'expérience est d'un mois. A cause de la putréfaction qui s'établit rapidement dans les milieux, ceux-ci sont renouvelés tous les deux jours.

A l'issue de l'expérience, les plantes sont broyées (feuilles et bulbes séparément), les extraits obtenus sont filtrés sur bougie Chamberland L3.

On recherche alors dans ces extraits, la présence d'agglutinines pour le *B. proteus*.

Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau de la page ci-contre.

La lecture de ce tableau indique que seuls les extraits de plantes ayant crû en eau salée, ou en solution minérale additionnée de cultures de *B. proteus*, présentent le pouvoir d'agglutiner le *B. proteus*. Les plantes témoins ayant crû en eau salée, eau distillée et solution minérale non additionnée de *B. proteus* n'agglutinent pas ce bacille.

La plante croissant dans un milieu additionné de *B. proteus*

| MILIEUX DE CROISSANCE EMPLOYÉS        | ORGANES<br>végétaux<br>broyés | TAUX DE DILUTION |      |       |       |
|---------------------------------------|-------------------------------|------------------|------|-------|-------|
|                                       |                               | 1/5              | 1/10 | 1/100 | 1/200 |
| Eau distillée. . . . .                | Feuilles.                     | —                | —    | —     | —     |
|                                       | Bulbes.                       | —                | —    | —     | —     |
| Eau salée . . . . .                   | Feuilles.                     | —                | —    | —     | —     |
|                                       | Bulbes.                       | —                | —    | —     | —     |
| Bouillon Liebig . . . . .             | Feuilles.                     | —                | —    | —     | —     |
|                                       | Bulbes.                       | —                | —    | —     | —     |
| Milieu Dufrenoy-Labrousse. . . . .    | Feuilles.                     | —                | —    | —     | —     |
|                                       | Bulbes.                       | —                | —    | —     | —     |
| Eau distillée et Proteus . . . . .    | Feuilles.                     | —                | —    | —     | —     |
|                                       | Bulbes.                       | —                | —    | —     | —     |
| Eau salée et Proteus. . . . .         | Feuilles.                     | —                | —    | +     | +     |
|                                       | Bulbes.                       | —                | —    | +     | ++    |
| Milieu Dufrenoy-Labrousse et Proteus. | Feuilles.                     | —                | —    | +     | +     |
|                                       | Bulbes.                       | —                | —    | +     | +     |
| Bouillon Liebig et Proteus . . . . .  | Feuilles.                     | —                | —    | ?     | ?     |
|                                       | Bulbes.                       | —                | —    | ?     | (1)   |

(1) L'agglutination n'était pas assez nette dans ces tubes pour conclure à une réaction positive.

a donc réagi et élaboré, vis-à-vis de ce bacille, une agglutinine spécifique, un anticorps.

Nous avons essayé sans succès, d'isoler le *B. proteus* des tissus de ces plantes ; nos cultures se sont montrées négatives, même pour des plantes traitées pendant un mois. On peut en déduire que :

Ou bien le microbe s'est développé pendant un certain temps dans ou sur la plante, puis a été détruit ; et la plante aurait élaboré les anticorps agglutinants que nous observons, au contact de ces germes vivants ou tués ;

Ou bien le microbe n'a pas pénétré à l'intérieur de la plante et ce seraient uniquement les cellules superficielles (cellules des poils absorbants en particulier) qui, en contact avec les corps microbiens, auraient élaboré des agglutinines.

Nous rapportons en tous cas le phénomène, quelle que soit son origine.

Remarquons que cette disposition : croissance de la plante dans un milieu riche en germes bactériens, se rapproche beaucoup des conditions normales de croissance de la plante qui se développe dans la terre, dont la flore bactérienne est par-



fois très riche. Il se peut donc que n'importe quelle plante élabore des anticorps, des agglutinines en particulier, contre les microbes qui sont abondants dans le sol où elle se développe. Peut-être certains « pseudo-anticorps » signalés par les auteurs sont-ils en réalité de véritables anticorps élaborés dans ces conditions.

#### DISCUSSION.

Les expériences d'agglutination rapportées précédemment, choisies parmi le grand nombre de celles que nous avons effectuées, nous permettent de conclure, dans certains cas, à l'apparition d'une propriété nouvelle dans le suc de plantes inoculées avec une bactérie donnée : celle d'agglutiner des suspensions de cette bactérie dans des conditions où les mêmes plantes témoins non inoculées ne présentent aucun pouvoir agglutinant. Cette propriété ne s'exerce que vis-à-vis de la bactérie qui a servi à préparer la plante.

Nous avons toujours effectué les réactions à la fois sur l'extrait de plantes traitées et sur l'extrait de plantes non traitées. Nous avons enregistré certaines expériences dans lesquelles ni la série témoin, ni la série en expérience n'agglutinaient. Nous en avons enregistré d'autres, beaucoup plus rares, dans lesquelles l'une et l'autre agglutinaient.

Enfin, nous en avons enregistré certaines dans lesquelles l'extrait de plantes traitées possédait seul, dans certaines conditions, la propriété d'agglutiner la bactérie que la plante avait hébergée.

Nous pensions que dans les deux premiers cas le résultat doit être regardé comme nul. Nous disons *nul*, et non pas *négatif*.

Nous ne pouvons, en effet, mettre en doute que les techniques que nous avons utilisées pour les déceler soient très imparfaites. Nous verrons que c'est l'imperfection de l'expérimentation plutôt que la carence des réactions de la plante qui doit être mise en cause dans nombre d'expériences à résultats semblant négatifs ; dans celles, en particulier, où il n'y a agglutination ni dans la série en expérience, ni dans la série témoin.

Dans les expériences où l'agglutination se produit dans les

deux séries, le résultat ne peut également s'interpréter de façon négative. Il se peut, en effet, que deux phénomènes se produisent simultanément : celui de l'agglutination due à la présence, dans le suc de la plante normale, de substances agglutinant les bactéries, et celui de l'agglutination due à la présence d'agglutinines spécifiques dans le suc de la plante traitée. L'acidité parfois élevée des extraits de plantes peut, en effet, être une cause de l'agglutination des bactéries. M. Lasseur a étudié ce phénomène, et a montré que l'acidité élevée du suc du fruit de *Citrus lemonum* provoquait l'agglutination des bactéries, de même que le suc de Bégonia, particulièrement acide ( $\text{pH} = 2,8$ ).

Mais, comme nous l'avons déjà remarqué, c'est un phénomène absolument général. Les suspensions des bactéries que cet auteur étudie, comme il le fait remarquer, précipiteraient tout aussi bien dans n'importe quelle solution acide de  $\text{pH} = 3$ .

Pour nous mettre à l'abri de cette cause d'erreur, nous avons déterminé le  $\text{pH}$  de quelques-uns des extraits végétaux que nous avons étudiés.

De façon générale, les extraits végétaux, sauf quelques rares cas, sont acides. Mais on peut cependant enregistrer de notables différences dans l'intensité de leur acidité.

Ceux obtenus par la méthode de broyage suivie de macération dans l'eau distillée neutre sont, en général, très voisins de la neutralité. Ceux obtenus en broyant la plante entière dans un broyeur, et qui se rapprochent sans doute davantage des contenus cellulaires, sont, en général, plus acides.

Des tubercules de pommes de terre placés en végétation durant les mois d'hiver ont donné, par exemple, par broyage, un extrait à réaction nettement alcaline :

|                              |                    |                    |
|------------------------------|--------------------|--------------------|
| Tubercules témoins. . . . .  | $\text{pH} = 8,40$ | $\text{pH} = 7,17$ |
| Tubercules inoculés. . . . . | $\text{pH} = 8,24$ | $\text{pH} = 7,65$ |

(Déterminations au moyen de l'électrode à hydrogène.)

Par contre, des Oignons placés à la même saison dans les mêmes conditions ont donné un extrait plus acide :

$\text{pH} = 5,20$        $\text{pH} = 5,84$ .

Il est bon de remarquer que le pH d'un extrait de plantes change avec une grande rapidité si cet extrait contaminé subit un début de fermentation : c'est une des raisons pour lesquelles la stérilisation des extraits doit être faite le plus rapidement possible.

De plus, l'extrait de plantes inoculées a souvent une acidité différente de l'extrait de plantes témoins. On peut l'expliquer, en partie du moins, dans le cas (de la Fève, par exemple) où la tige de plante peut contenir des quantités relativement importantes de cultures bactériennes (environ 1 cent. cube) qui lui ont été inoculées. Le bouillon de culture, de réaction alcaline, dilue un peu l'extrait de plantes et ramène son pH vers la neutralité.

Remarquons, en passant, que les extraits des plantes inoculées semblent avoir des propriétés physico-chimiques différentes des extraits de plantes traitées : couleur, stabilité (précipitation spontanée des substances colloïdales en suspension dans l'extrait), acidité, rapidité de filtration, sont différentes dans les deux cas.

Dans les expériences d'agglutination, l'acidité de la réaction dépend d'ailleurs surtout de celle de la suspension microbienne. Or, les suspensions microbiennes en eau physiologique que nous avons employées sont presque neutres. Et l'addition d'un extrait de plantes, même nettement acide, ne déplace qu'un peu vers l'acidité la réaction de l'ensemble.

C'est ainsi que dans un cas où l'extrait d'un tubercule de Pomme de terre présentait une acidité nette (3,842), l'addition de cet extrait, au taux de 1/100 à une suspension de Gärtner en eau physiologique a donné une solution de  $\text{pH} = 6,76$ , acidité insuffisante pour provoquer une agglutination d'acidité.

Outre les ions acides, on a signalé, dans le suc des plantes, certains principes agglutinant les bactéries que l'on trouve à la fois dans les plantes témoins et dans les plantes d'expérience. Ce sont les « pseudo-anticorps » des auteurs.

Nous avons fait, à plusieurs reprises, la recherche de ces « pseudo-anticorps ». Or, il s'est trouvé que dans le cas des plantes (*Vicia faba*, *Solanum tuberosum*, *Allium cepa*) et

des microbes étudiés (B. de Gärtner, *B. proteus*), les cas d'agglutination des bactéries par les extraits de plantes normales ont été extrêmement rares. Nous citons, avec l'expérience effectuée sur les extraits de *Solanum tuberosum*, un des rares cas où nous ayons observé une agglutination très nette par un extrait de plantes normales.

Mais, même dans le cas où l'agglutination se produit à la fois dans la série témoin et dans la série d'expérience, le phénomène spécifique ne peut être confondu souvent avec le phénomène non spécifique. Si l'on prépare, en effet, une échelle de dilutions assez étendue, on s'aperçoit alors que le taux de dilution limite pour l'agglutination n'est pas le même dans la série témoin et dans la série d'expérience. Les deux phénomènes sont juxtaposés, et peuvent souvent se distinguer l'un de l'autre. Et cette remarque répond, nous le pensons, à l'objection que formule Manil, entre autres auteurs, de la façon suivante :

« Pour conclure avec certitude, dans ce domaine, les auteurs qui ont obtenu des résultats qu'ils jugent positifs ne parlent pas de l'élimination préalable des pseudo-anticorps normaux, qui sont de nature, je pense, à troubler les résultats ».

## II. — RECHERCHE DES PRÉCIPITINES.

Sur des extraits de plantes préparées de la façon indiquée plus haut, nous avons opéré la recherche d'anticorps au moyen de la technique de précipitation.

TECHNIQUE GÉNÉRALE. — La recherche des précipitines se fait, comme dans la technique médicale, en additionnant d'extraits de plantes en quantité variable, un filtrat de cultures microbiennes âgées d'au moins un mois, obtenu par passage sur bougie Chamberland L3.

Les tubes sont mis une heure à l'étuve à 37°, puis laissés un temps variable à 20°, température du laboratoire.

Nous donnons ici le protocole de deux expériences qui nous ont donné un résultat particulièrement net.



EXPÉRIENCE 1. — *Plante employée* : *Vicia faba* inoculée suivant la méthode indiquée plus haut, de culture de *B. proteus* de vingt-quatre heures en bouillon Liebig. Seules les tiges de la plante ont été utilisées pour la recherche des anticorps.

*Préparation de l'extrait de plantes* : Les extraits ont été préparés après broyage et macération (suivant la technique 1, p. 536). Mais nous avons séparé l'extrait des plantes traitées et l'extrait des plantes normales témoins (inoculées d'eau salée) en plusieurs fractions ; chaque fraction a été soumise à un mode spécial de filtration : a) filtration sur terre d'infusoire ; b) filtration sur noir animal ; c) filtration sur bougie L3.

*Préparation du filtrat de cultures microbiennes* : On filtre sur bougie L3, une culture microbienne vieille de trois semaines.

*Préparation de l'expérience* : On ajoute à X gouttes de filtrat de culture microbienne, I ou II gouttes de l'extrait de plantes, qui se trouve ainsi dilué au 1/5 ou au 1/10.

### Résultat de l'expérience :

| NATURE DE L'EXTRAIT   | DILUTION |      |
|---|----------|------|
|   | 1/5      | 1/10 |
| —   | —        | —    |
| Extrait de plantes témoins filtré sur bougie Chamberland L3 . . . . .     | —        | —    |
| Extrait de plantes témoins filtré sur terre d'infusoire . . . . .         | —        | —    |
| Extrait de plantes d'expérience filtré sur bougie Chamberland L3. . . . . | ? (4)    | ?    |
| Extrait de plantes d'expérience filtré sur terre d'infusoire. . . . .     | +        | +    |
| Extrait de plantes d'expérience filtré sur noir animal . . . . .          | +++      | +++  |
| Filtrat de culture microbienne seul : pas de précipité.                   |          |      |

EXPÉRIENCE N° 2. — *Plante choisie* : *Vicia faba* inoculée trois fois, à huit jours d'intervalle à l'aide d'une culture en bouillon de *B. proteus*, de vingt-quatre heures. On sacrifie les plantes d'expérience quarante-huit heures après la dernière inoculation. On ne fait la recherche des anticorps que sur les tiges des plantes.

Pour servir de plantes témoins, on prépare, en même temps, une série de fèves inoculées aux mêmes dates avec de l'eau salée.

*L'extraction du suc cellulaire* se fait par broyage au mortier suivi de macération dans l'eau distillée (technique 1, p. 41); On filtre l'extrait sur terre d'infusoire.

*Expérience* : on emploie le filtrat d'une culture de *B. proteus* en bouillon, conservée un mois au laboratoire. La réaction se fait dans des

(4) Le précipité donné par ces deux tubes était peu abondant et nous n'avons pas pu interpréter ce résultat positivement.

tubes à hémolyse sous un volume de XX gouttes. L'extrait de la plante essayé est dilué au 1/10 et au 1/20 du volume total.

On place la réaction une heure à l'étuve à 37° et on la lit après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire.

### Résultat :

| NATURE DE L'EXTRAIT  | DILUTIONS |      |
|--|-----------|------|
|  | 1/10      | 1/20 |
| Extrait de fèves préparées I . . . . .                           | +         | +    |
| Extrait de fèves préparées II. . . . .                           | +         | +    |
| Extrait de fèves témoins inoculées d'eau physiologique . . . . . | —         | —    |

Le résultat de ces expériences a été net : nous avons obtenu un abondant précipité dans le cas du mélange du filtrat de culture microbienne avec l'extrait de plantes traitées et dans ce cas seulement. Ce résultat nous permet de conclure dans un sens positif quant à la formation d'anticorps précipitants par la plante. Le filtrat obtenu sur noir animal a été celui qui a présenté la plus forte réaction, dans le cas où l'on a effectué la recherche des précipitines dans un extrait de plantes soumis à différentes filtrations. La filtration sur noir animal est donc celle qui altère peut-être le moins, la composition de l'extrait de plantes.

La lecture des réactions de précipitation demande plus de soins encore que celle des réactions d'agglutination. Il se peut, en effet, que des précipitations de substances colloïdales en solution dans les extraits de plantes se produisent spontanément, et viennent interférer avec la réaction de précipitation due à l'action spécifique de l'antigène. Mais dans ce cas, la précipitation non spécifique se produit également dans le témoin. Toute expérience dans laquelle le témoin a précipité doit donc être considérée comme nulle.

### III. — RECHERCHE DES LYSINES.

#### A. — Par lyse effectuée « *in vitro* ».

Nous avons vu, dans les expériences précédentes, que les plantes inoculées par des cultures bactériennes réagissent à l'inoculation de ces cultures, par formation d'anticorps :

agglutinines et précipitines. La recherche de la sensibilisatrice dans une série d'expériences que nous ne rapportons pas ici nous a conduite à des résultats beaucoup moins nets. Mais nous avons pensé que ces sensibilisatrices, en général des lysines, pouvaient peut-être se mettre en évidence d'une autre façon. Les expériences d'inoculation sur les cobayes, d'extraits de plantes préparées, que nous exposerons plus loin dans ce travail, mais que nous menions parallèlement avec nos recherches techniques sérologiques, nous montraient, par ailleurs, que tout se passait comme si la plante formait une quantité relativement importante de bactériolysines.

La recherche des bactériolysines est d'un emploi courant en sérologie animale : elle consiste à mettre en contact une émulsion microbienne et un sérum bactériolytique, frais ou additionné d'alexine, pendant des temps variables et à faire une numération par culture en gélose, d'une part de l'émulsion bactérienne seule, d'autre part du mélange sérum-émulsion. La diminution du nombre de germes comptés dans le deuxième cas, par rapport à celui relevé dans le premier, indique l'existence de l'action bactériolytique du sérum, et permet d'en évaluer l'importance. C'est cette technique que nous avons suivie. Nous n'avons pas ajouté d'alexine à nos extraits parce que nous avons démontré, dans une de nos expériences, que ce corps n'existait pas dans les plantes normales. Certains auteurs ont cependant mis en évidence, dans certaines plantes, un agent lytique analogue à l'alexine. Peut-être est-ce la présence de cet agent qui a, au cours de nos expériences, permis la lyse bactérienne que nous avons constatée. Quoi qu'il en soit, cette lyse existe, l'expérience suivante en fait foi.

Nous nous sommes adressée à un matériel infecté naturellement, et nous avons choisi des légumineuses infectées de leurs bactéries commensales.

Nous avons, dans ce but, fait en serre, deux cultures de *Vicia sativa* : l'une en terre ordinaire (qui a donc formé des nodosités bactériennes) ; l'autre en terre préalablement stérilisée au formol (qui s'est donc trouvée privée de nodosités).

De la première culture, nous avons isolé une souche de bactéries des nodosités. Et, une fois cet isolement fait, nous avons

sacrifié les vesces des deux cultures. Nous les avons broyées, nous avons filtré sur bougie Chamberland L3 l'extrait ainsi obtenu.

Soit T : l'extrait obtenu à partir des plantes privées de nodules ;

Soit E : l'extrait obtenu à partir des plantes à nodules.

Dans trois tubes à essais, nous avons opéré les mélanges indiqués fig. 2.

Nous avons porté le tout au frigorifique à  $-3^{\circ}$  et laissé dix jours en contact les différents liquides.

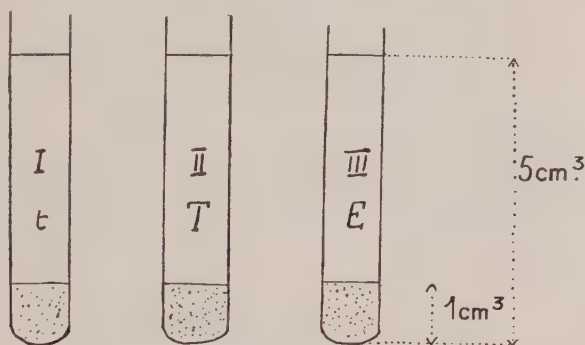


Fig. 2. — Tube I. 1 cent. cube de culture de vingt-quatre heures de bactéries de nodosités en bouillon + 4 cent. cubes d'eau stérile.

Tube II. 1 cent. cube de culture de vingt-quatre heures de bactéries de nodosités en bouillon + 4 cent. cubes d'extrait de plantes sans nodules.

Tube III. 1 cent. cube de culture de vingt-quatre heures de bactéries de nodosités en bouillon + 4 cent. cubes d'extrait de plantes à nodules.

Puis nous avons compté le nombre de germes au centimètre cube. Les résultats ont été les suivants :

|                           |                                    |
|---------------------------|------------------------------------|
| Tube eau stérile. . . . . | 75.000 germes par centimètre cube. |
| Tube T . . . . .          | 55.000 germes par centimètre cube. |
| Tube E . . . . .          | 25.000 germes par centimètre cube. |

Il existe donc, dans l'extrait de plantes infectées de nodosités bactériennes, un principe qui produit *in vitro*, une diminution du nombre de germes, qui sont mis en contact avec cet extrait.

Cette expérience apporte un argument de plus à notre théorie de la nature lytique de certains anticorps élaborés par la plante.



B. — *Inoculation à des animaux de laboratoire  
de mélanges de cultures microbiennes et d'anticorps  
élaborées par les plantes.*

Les résultats positifs des expériences que nous avons rapportées plus haut permettaient de conclure à la présence, dans le suc de la plante infectée par une bactérie, de substances élaborées dans la lutte contre cette bactérie.

Nous avons pensé d'abord que ces substances, ou une partie d'entre elles, pouvaient avoir des propriétés vaccinales. Inoculées en mélange avec l'antigène qui les avait fait naître, elles pouvaient peut-être protéger un organisme contre l'action pathogène de cet antigène.

Nous avons, à ce moment, comme matériel, des plantes (*Vicia faba*) inoculées de *B. proteus*. Ces plantes, chez lesquelles nous avons déjà démontré la formation d'agglutinines et de précipitines, avaient peut-être élaboré ce principe vaccinant dont nous supposons l'existence.

Mais le *B. proteus* n'est pas pathogène pour les fèves, et nous avons dû utiliser, pour mettre en évidence le principe vaccinant, un sujet d'expérience réceptif pour *B. proteus*. Nous avons choisi le cobaye. Si l'extrait de plantes a un pouvoir protecteur, les réactions du sujet inoculé avec un mélange d'extrait de plantes et de culture de *B. proteus* seront moins violentes que celles du sujet qui aura reçu le *B. proteus* seul.

Nous avons donc fait une série d'expériences dans lesquelles nous inoculons à des cobayes, des mélanges, aux proportions variables, d'extraits de plantes préparées avec *B. proteus* et de cultures de *B. proteus*. Nous inoculons en même temps, comme témoins, d'autres cobayes avec :

- a) des mélanges d'extraits de plantes normales et de cultures de *B. proteus* ;
- b) des extraits de plantes, préparées ou non ;
- c) des cultures de *B. proteus* seul.

Les cultures de *B. proteus* étaient faites en bouillon Liebig et vieilles de vingt-quatre heures.

| COBAYES TÉMOINS  |  |   | COBAYES PRÉPARÉS  |
|--|--|---|---|
| Cobayes inoculés avec des extraits de plantes normales | Cobayes inoculés avec des extraits de plantes traitées | Cobayes inoculés avec des cultures de <i>B. proteus</i>   | Cobayes inoculés avec mélange culture de <i>B. proteus</i> + extrait de plantes traitées  |
| 5 cent. cubes : aucun symptôme.                        | 5 cent. cubes : aucun symptôme.                        | 0 c. c. 5 P. : amaigrissement (482 gr., 465 gr., 470 gr.). Guérison.<br>1 cent. cube P. : amaigrissement. Guérison.   | 0 c. c. 5 P. + 3 cent. cubes : amaigrissement (430 gr., 400 gr., 410 gr.). Guérison.<br>1 cent. cube P. + 5 cent. cubes : aucun symptôme.       |
|  |  | 1 c. c. 5 P. : amaigrissement (495 gr., 480 gr., 495 gr.). Guérison.  | 1 c. c. 5 P. + 1 cent. cube : amaigrissement. Guérison.   |
|  |  | 1 c. c. 5 P. + 3 cent. cubes : amaigrissement (488 gr., 475 gr., 505 gr.). Guérison.<br>1 c. c. 5 P. : 5 cent. cubes : amaigrissement (460 gr., 435 gr., 470 gr.). Guérison.<br>1 c. c. 5 P. + 5 cent. cubes : mort dans les 48 heures. | 1 c. c. 5 P. + 3 cent. cubes : amaigrissement (475 gr., 455 gr., 460 gr.). Guérison.<br>1 c. c. 5 P. + 5 cent. cubes : mort dans les 12 heures. |
|  |  | 2 cent. cubes P. : amaigrissement (440 gr., 430 gr., 450 gr.). Guérison.  | 1 c. c. 5 P. + 5 cent. cubes : mort dans les 12 heures.<br>2 cent. cubes P. + 2 cent. cubes : mort dans les 12 heures.                          |
|  |  | 2 c. c. 5 P.  | 2 cent. cubes P. + 5 cent. cubes : mort dans les 12 heures.   |
|  |  | 3 cent. cubes P. : mort dans les 12 heures.<br>5 cent. cubes P. : mort dans les 12 heures.  | 2 c. c. 5 P. + 2 c. c. 5 : mort dans les 12 heures.   |

Les extraits de plantes étaient obtenus par broyage et macération des plantes étudiées (suivant la technique 1, p. 536). Seules les tiges des plantes avaient été utilisées.

Nous avons consigné, dans les tableaux suivants, les résultats de nos expériences.

**Lésions relevées à l'autopsie d'un cobaye inoculé de 3 cent. cubes de bouillon de culture de *B. proteus*.**

*Mort en vingt-quatre heures.*

Péritonite;  
Rate normale;  
Suffusion sanguine à l'estomac;  
Intestin normal;  
Vésicule biliaire normale, remplie de bile;  
Ganglions inguinaux et mésentériques.

**Comparaison des lésions relevées à l'autopsie de deux cobayes.**

| <i>Cobaye témoin :</i>                                      | <i>Sujet d'expérience :</i>   |
|---|---|
| Proteus. . . . . 2 c. c. 5                                  | Proteus. . . . . 2 c. c. 5  |
| Extrait plantes normales . . 2 c. c. 5                      | Extrait plantes préparées . . 2 c. c. 5                                     |
| Péritoine normal.   | Péritonite aiguë, purulente.  |
| Rate normale.   | Rate hypertrophiée, noire.  |
| Estomac normal.   | Suffusions sanguines dans les parois de l'estomac.                          |
| Légère congestion du tractus intestinal.                    | Congestion intense de tout l'intestin qui renferme des liquides et des gaz. |
| Vésicule biliaire normale, gonflée de bile.                 | Vésicule biliaire à parois rétractées, vide.                                |
| Ganglions légèrement congestionnés (mésentérique et cœcal). | Ganglions fortement congestionnés.  |

**Comparaison des lésions présentées par deux cobayes.**

| <i>Cobaye témoin :</i>                                  | <i>Sujet d'expérience :</i>   |
|---|---|
| Proteus. . . . . 1 c. c. 5                              | Proteus. . . . . 1 c. c. 5  |
| Extrait plantes normales . . 5 cent. cubes.             | Extrait plantes anti-proteus . . 5 cent. cubes.                             |
| Douleur à la palpation.                                 | Mort en 24 heures.  |
| Amaigrissement (460 grammes, 435 grammes, 470 grammes). | Péritonite aiguë purulente.   |
| Guérison.   | Rate noire.   |
|   | Suffusions sanguines à l'estomac.   |
|   | Congestion intense de tout l'intestin qui renferme des liquides et des gaz. |
|   | Vésicule biliaire vide à parois rétractées.                                 |
|   | Ganglions mésentérique et cœcal fortement congestionnés.                    |
|   | Congestion pulmonaire.  |

Les animaux témoins inoculés avec un extrait de plantes normales ou préparées ne présentent aucun symptôme pathologique.

Nous avons plus tard répété cette expérience, mais en variant le matériel étudié.

Le microbe d'essai était le B. de Gärtner, que l'on inoculait à *Solanum tuberosum*, sur lequel s'opérait comme précédemment la recherche des anticorps par passage sur le cobaye.

Nous avons, dans ce but, inoculé trois séries de cobayes :

Chaque cobaye de la première série a reçu une certaine quantité de culture de vingt-quatre heures, de B. de Gärtner en bouillon ;

Chaque cobaye de la seconde série a reçu la même quantité de B. de Gärtner que le cobaye correspondant de la première série, mais en mélange avec 5 cent. cubes d'extrait de *Solanum tuberosum* normal ;

Chaque cobaye de la troisième série a été traité de la même façon que le cobaye correspondant de la seconde, mais il a reçu de l'extrait de *Solanum tuberosum* anti-Gärtner à la place de l'extrait de *Solanum tuberosum* normal.

Une grande différence s'est manifestée entre les durées de survie des cobayes des différentes séries. Nous avons consigné ces durées de survie dans le tableau suivant :

**Durée de survie de cobayes inoculés avec B. de Gärtner additionné ou non d'extrait de plantes.**

| B. de Gärtner<br>seul  | B. de Gärtner<br>+ extrait plantes normales                         | B. de Gärtner<br>+ extrait plantes préparées                       |
|--|---|--|
| 1 cent. cube de culture<br>de 24 heures de B.<br>Gärtner en bouillon :<br>survie de 8 jours.                     | 1 cent. cube G. + 5 cent.<br>cubes extrait : survie<br>de 10 jours. | 1 cent. cube G. + 5 cent.<br>cubes extrait : survie<br>de 6 jours. |
| 1 c. c. 5 : survie de 7 jours.   | 1 c. c. 5 G. + 5 cent. cubes<br>extrait : survie de 4 jours.        | 1 c. c. 5 G. + 5 cent.<br>cubes extrait : survie<br>de 1 jour.     |
| 2 cent. cubes : survie de<br>2 jours.  | 2 cent. cubes G. + 5 cent.<br>cubes extrait : survie<br>de 1 jour.  | 2 cent. cubes G. + 5 cent.<br>cubes extrait : survie<br>de 1 jour. |
| Poids moyen : 400 grammes. Expérience du 8 mai 1936. Extrait de plante seul : pas de<br>symptômes pathologiques. |   |  |



Les différences entre les caractères pathogènes des liquides inoculés s'exercent dans le même sens que dans l'expérience avec le *B. proteus*. C'est-à-dire que :

Si l'on inocule 1 cent. cube de culture de *B. de Gärtner* seule à un cobaye, le cobaye meurt, en moyenne, en huit jours.

Si l'on inocule 1 cent. cube de culture de *B. de Gärtner* en mélange avec 5 cent. cubes d'extrait de plantes normales à un cobaye identique, celui-ci meurt à peu près dans les mêmes délais que le précédent, ou parfois un peu plus vite.

Enfin, si l'on inocule à un cobaye, un mélange de culture de *B. de Gärtner* et d'extrait de plantes anti-Gärtner, la mort arrive deux fois plus vite.

L'extrait de plantes anti-Gärtner contient donc un principe capable d'activer la virulence du *B. de Gärtner*.

Les résultats de cette expérience ont été peut-être plus nets que ceux de l'expérience avec le *B. proteus*. Ce dernier germe se montrait, en effet, si pathogène pour le cobaye qu'il était difficile d'obtenir des péritonites à évolution lente et que les différences entre les survies des cobayes, indice des différences entre les caractères pathogènes des mélanges inoculés, étaient beaucoup plus faibles.

L'étude des résultats de nos expériences nous conduit aux conclusions suivantes :

1° *Les extraits de plantes*, qu'elles soient préparées ou non, ne sont pas nocifs pour le cobaye (en injection intrapéritonéale, même au taux élevé de 5 cent. cubes).

2° *Le Proteus* que nous avons utilisé dans nos expériences s'est montré pathogène pour le cobaye dans les conditions suivantes : en injection intrapéritonéale, une culture de vingt-quatre heures en bouillon Liebig n'amène pas la mort si elle est inoculée à des doses variant de 0 c. c. 5 à 2 cent. cubes. Le sujet inoculé présente seulement des troubles péritonéaux d'intensité variable, un amaigrissement passager, puis la guérison survient. Les doses supérieures à 3 cent. cubes amènent la mort dans les vingt-quatre heures. Les lésions relevées à l'autopsie sont les suivantes : péritoine congestionné, avec liquide dans le péritoine dans certains cas, quelques suf-

| COBAYES TÉMOINS (INOCULATION AU PÉRITOINE) |   |  |   | COBAYES D'EXPÉRIENCE  |  |
|--|---|--|---|---|--|
| Extrait de plantes normales                | Extrait de plantes d'expérience         | Culture de <i>B. Gärtner</i>   | Culture de <i>B. Gärtner</i> + extrait de plantes non préparées   | Culture de <i>B. Gärtner</i> + extrait de plantes préparées   |  |
| 5 cent. <i>cubes</i> : aucune réaction.    | 5 cent. <i>cubes</i> : aucune réaction. | 1 cent. <i>cube</i> : mort en 8 jours. Abès au point d'inoculation, rate petite, mais congestionnée, capsule sur-rénale normale, ganglions à l'aine et à l'aisselle légèrement congestionnés.  | 1 cent. <i>cube G.</i> + 5 cent. <i>cubes plantes non préparées</i> : mort en 10 jours.   | 1 cent. <i>cube G.</i> + 5 cent. <i>cubes extrait plantes préparées</i> : mort en 6 jours. Ganglions à l'aine et à l'aisselle hypertrophiés, péritonite, rate congestionnée.  |  |
| 5 cent. <i>cubes</i> : aucune réaction.    | 5 cent. <i>cubes</i> : aucune réaction. | 1 c. c. 5 : mort en 7 jours. Péritonite, rate hypertrophiée et congestionnée, pleurésie, pus sur le foie et la rate.   | 1 c. c. 5 <i>G.</i> + 5 cent. <i>cubes plantes non préparées</i> : mort en 4 jours. Péritonite purulente, liquide dans l'intestin, ganglions des aines congestionnés et hypertrophiés.  | 1 c. c. 5 <i>G.</i> + 5 cent. <i>cubes plantes préparées</i> : mort en 24 heures. Gros œdème au point d'inoculation, péritonite purulente, ganglions mésentériques hypertrophiés et congestionnés.  |  |
| 5 cent. <i>cubes</i> : aucune réaction.    | 5 cent. <i>cubes</i> : aucune réaction. | 2 cent. <i>cubes</i> : mort en 2 jours. Péritonite purulente, ganglions à l'aine et à l'aisselle congestionnés, pus sur le foie, rate congestionnée, gaz et liquide dans l'intestin, ganglion mésentérique congestionné et hypertrophié, intestin très dilaté. | 2 cent. <i>cubes G.</i> + 5 cent. <i>cubes plantes non préparées</i> : mort en 24 heures. Péritonite purulente, ganglions des aines et des aisselles congestionnés, ganglion mésentérique hypertrophié et congestionné, rate très congestionnée, gaz et liquide dans l'estomac et l'intestin. | 2 cent. <i>cubes G.</i> + 5 cent. <i>cubes plantes préparées</i> : mort en 24 heures. Péritonite purulente, ganglions des aines et des aisselles congestionnés, ganglion mésentérique hypertrophié et congestionné, rate très congestionnée, gaz et liquide dans l'estomac et l'intestin. |  |

fusions sanguines à l'estomac, ganglions inguinaux, mésentériques et lombaires hypertrophiés.

3' *L'inoculation des mélanges de culture de B. proteus et d'extraits de plantes* produit des symptômes différents de ceux observés après l'inoculation de *B. proteus* seul. Ces symptômes diffèrent en outre, entre eux, suivant que la plante a été ou non préparée par inoculation de *B. proteus* seul.

En résumant brièvement nos observations, nous pouvons dire que *la dose mortelle de culture de B. proteus est atteinte plus rapidement si l'on ajoute un extrait de Vicia faba que si l'on n'en ajoute pas.*

Alors que pour un cobaye de 450 à 500 grammes la dose mortelle de *B. proteus* est de 3 cent. cubes quand on l'inocule seul, elle n'est plus que de 2 c. c. 5 quand on l'inocule en mélange avec un extrait de plantes normales et de 1 c. c. 5 quand on l'inocule avec un extrait de plantes préparées.

De plus, et c'est le résultat qui se dégage le plus nettement de nos expériences : *les symptômes présentés par les cobayes inoculés avec des mélanges de culture de B. proteus et d'extraits de plantes préparées sont plus sévères que ceux présentés par les cobayes inoculés avec des mélanges de cultures de B. proteus et d'extraits de plantes normales, et les lésions relevées à l'autopsie sont toujours plus étendues.*

Nous renvoyons, pour illustrer cette affirmation, au tableau p. 539 indiquant les conditions dans lesquelles la mort s'est produite, et ceux dans lesquels sont consignés la différence relevée à l'autopsie entre les lésions des cobayes inoculés avec les mélanges.

Nous avons exceptionnellement constaté (cas des faibles doses de *B. proteus*, 1 cent. cube et 1 c. c. 5) que le cobaye inoculé avec des cultures de *B. proteus* additionnées d'extraits de plantes préparées présentait des symptômes pathologiques moins accentués que les cobayes inoculés avec du *B. proteus* seul, ou avec du *B. proteus* additionné d'extraits de plantes normales.

Les phénomènes que nous avons observés au cours de nos expériences sont donc complexes à analyser. Mais tous conduisent à conclure que l'injection, dans le péritoine d'un

cobaye, d'un mélange de bouillon de culture de *B. proteus* et d'extraits de plantes préalablement inoculées avec du *B. proteus*, provoque des symptômes différents de ceux que l'on observe lorsqu'on inocule à un cobaye une culture de *B. proteus* seule ou additionnée d'extraits de plantes normales. Le sens dans lequel se produit cette différence (augmentation ou diminution des symptômes) importe peu à notre thèse. Le fait important est qu'elle existe et qu'elle ne peut s'expliquer que par l'existence d'un anticorps formé par la plante préparée.

Les phénomènes observés peuvent être expliqués ainsi :

L'extrait de *Vicia faba* normal exerce en dehors de la présence de tout principe élaboré contre le *B. proteus*, une action sur les cultures de ce bacille. Ce fait indéniable est démontré par l'abaissement de la dose mortelle de *B. proteus* (4 c. c. 5 ou 2 cent. cubes, ou 2 c. c. 5 selon la quantité d'extrait de plantes ajoutée), au lieu de 3 cent. cubes dans le cas où la culture de *B. proteus* est injectée seule. Il faut donc admettre la présence, dans la plante normale, préalablement à toute préparation, d'une substance capable d'agir sur le microbe qu'on lui ajoute, pour en augmenter la virulence. Il est peu vraisemblable que ce soit au développement de ce germe dans l'extrait même qu'il faille attribuer l'action que nous rapportons. Nous indiquons cependant cette possibilité.

Mais l'extrait de *Vicia faba* inoculé avec des cultures de *B. proteus* a une action beaucoup plus forte sur les cultures de ce bacille que l'extrait de plantes normales.

Dans deux cas seulement, ceux où nous avons inoculé de faibles doses de *B. proteus*, les cobayes qui ont reçu l'extrait de plantes préparées ont moins souffert que les autres. Et si nous avons borné là notre expérience, nous aurions pu conclure à la présence de ce principe vaccinant que nous recherchions.

Dans tous les autres cas, au contraire, ceux où les doses de *B. proteus* inoculées ont été beaucoup plus fortes (4 c. c. 5 à 2 c. c. 5), l'action de l'extrait de plantes préparées a excité la virulence du microbe : la mort est arrivée plus fréquemment que chez les témoins, plus rapidement, et les lésions constatées à l'autopsie ont été plus étendues. Tout se passe comme si l'ex-



trait de plantes préparées contenait une substance élaborée qui agit sur le microbe pour exalter sa virulence.

Peut-on, à la lumière des théories de l'immunité aujourd'hui admises, expliquer ces faits ?

Rappelons à ce sujet, pour mémoire, les différentes catégories que Maurice Nicolle établit dans les anticorps :

« Les anticorps artificiels peuvent être divisés en trois groupes suivant la nature des « corps » ou antigènes correspondants :

« a) *les anticorps des cellules animales, végétales ou microbiennes*, comprennent deux types bien connus et diamétralement opposés dans leur action : les *cytocoagulines* (agglutinines) et les *cytolysines*. Les cytocoagulines, agents de condensation, modifient l'état physique et chimique de tous les éléments sensibles, morts ou vivants, et paralysent, durant leur vie, ceux de ces éléments qui sont doués de mobilité. Ils ne déterminent le phénomène de l'agglomération qu'*in vitro* (ou *in vivo*, dans des conditions rares et pratiquement équivalentes). Les cytolysines, agents de décondensation, attaquent les cellules d'une façon plus ou moins brutale et en libèrent des poisons auxquels on peut donner le nom d'endotoxines vraies ». L'intoxication résultante n'est toutefois réalisable que si la cytolyse s'accomplit assez vite et intéresse, bien entendu, une masse suffisante de substance cellulaire. Cette cytolyse se manifeste *in vitro*, dans certain cas, à un degré plus ou moins marqué ;

« b) *les anticorps des matières albuminoïdes animales, végétales ou microbiennes* qui jouissent du pouvoir antigène, comprenant les *albumino-coagulines* (précipitines) et les *albumino-lysines* (conception nouvelle). Les albumino-coagulines condensent les substances sensibles, mais ne les précipitent qu'*in vitro*. Les albumino-lysines attaquent les matières albuminoïdes et en libèrent, ici encore, les endotoxines vraies. On peut considérer comme endotoxines brutes les portions de la substance des cellules et les constituants des extraits cellulaires et les humeurs qui engendrent les endotoxines vraies lors de la cytolyse et de l'albuminolyse. Cette dernière ne s'accompagne, *in vitro*, d'aucune modification discernable ;

« c) les anticorps des « toxines solubles » animales, végétales ou microbiennes, comprenant les *toxinocoagulines* (antitoxines) et les *toxinolysines* (conception nouvelle). Les *toxinocoagulines* condensent les toxines (brutes) sensibles sans que cette condensation se manifeste à l'œil nu, (au microscope), ou à l'ultramicroscope. Les *toxynolysines* attaquent ces mêmes toxines et en libèrent les toxines vraies, sans qu'il y ait non plus de changements visibles *in vitro*. On peut considérer comme toxines brutes les constituants des extraits cellulaires ou des filtrats microbiens qui engendrent les toxines vraies lors de la toxinolyse. Inutile de rappeler que, bien souvent, on introduit à la fois, dans l'organisme animal, des endotoxines brutes et des toxines brutes, sous des formes concrètes d'ailleurs très variées ».

Tout se passe, dans nos expériences, comme si les anticorps produits par la plante après traitement par des cultures de *B. proteus*, étaient de ces deux types désignés par M. Nicolle sous les noms de : cytoagglutinines et de cytolyssines.

En fait, nous avons mis en évidence des agglutinines *in vitro* dans de semblables extraits, et des lysines. Or, les proportions de ces deux catégories d'anticorps peuvent varier, de même que les proportions de ces anticorps avec l'antigène.

« Les antigènes, écrit M. Nicolle, subissent, de la part de l'organisme, une véritable digestion (Metchnikoff). Or, on admet de plus en plus aujourd'hui, que tout acte digestif exige le concours successif d'une coaguline et d'une lysine. La même conception s'impose d'autant mieux, pour expliquer le mode d'action des anticorps normaux, que ceux-ci nous apparaissent toujours sous les formes exclusives de coagulines et de lysines. Toutefois, les proportions respectives des deux anticorps peuvent varier et les effets produits traduisent ces variations. Ainsi, étant donné un antigène déjà toxique, si la coagulation est forte, la lyse (secondaire) demeurera lente et la substance étrangère disparaîtra, petit à petit, sans avoir altéré l'organisme par les poisons vrais qu'elle recélait et qui ont été libérés à doses constamment imperceptibles ; si la coagulation est faible, la lyse sera rapide et suivie d'une intoxication plus ou moins marquée selon les cas. »

Le cas où l'addition à la culture de *B. proteus*, d'un extrait de plantes préparées semble neutraliser cet effet serait celui où la coagulation des cellules pathogènes est rapide, presque totale et la lyse lente à s'effectuer ; au contraire, le cas où la virulence de la culture est exagérée par l'addition de ce même extrait (cas des doses plus fortes de *B. proteus*) serait celui où la coagulation serait lente, ou n'atteindrait qu'une petite part de la dose inoculée, alors que la lyse s'étendrait rapidement à tous les germes de *B. proteus* inoculés. Il y a, dans ce cas, immunisation ; et dans l'autre, hypersensibilisation, mais les processus sont les mêmes. Seules varient leurs ampleurs respectives.

Nous n'avons pas pu, jusqu'ici, au cours de nos expériences, déterminer les conditions dans lesquelles se formait de préférence l'un ou l'autre anticorps. Nous aurions dû envisager systématiquement l'influence du mode d'extraction du suc cellulaire, l'influence des proportions du mélange, l'influence du mode d'inoculation, etc... Nous ne pouvions pas finir un tel travail avant un temps assez long parce que l'importance de chacun de ces facteurs nous est actuellement inconnue, et ceci explique l'inconstance de nos résultats. Mais cette inconstance ne peut pas nous empêcher de conclure avec certitude à l'apparition d'un anticorps lytique ou coagulant dans l'extrait de plantes inoculées à l'aide d'un germe donné.

Il est intéressant de rapprocher de notre hypothèse sur la prépondérance de lysines dans les anticorps élaborés par les plantes, l'expérience suivante dont nous trouvons le détail dans la publication de Manil : « Contribution à l'étude de l'immunité chez les plantes ».

Manil, recherchant si certains microbes pathogènes pour les plantes (*B. tabacum*, *B. syringæ*) provoquent la nécrose des tissus par l'émission d'une toxine, fut amené à étudier l'action des filtrats des cultures de ces germes sur les tissus végétaux.

Il cultivait ces bactéries sur des milieux divers, à des pH variables, puis inoculait des filtrats de ces cultures (obtenus sur bougie Chamberland L3) à des plantes d'expérience (Tabacs, Lilas, Haricots). Il ne parvenait jamais à mettre en évidence, de cette façon, une action toxique de ces filtrats.

Il eut alors l'idée de préparer des extraits de feuilles de tabac infectées de *B. tabacum*. Cet extrait obtenu par broyage, est filtré sur papier. Le liquide limpide obtenu ainsi est inoculé à des feuilles de tabac. Comme il contient des germes de *B. tabacum*, il provoque, sur les feuilles, des lésions caractéristiques. Mais le fait intéressant est le suivant : « Cet extrait produit plus rapidement les lésions typiques qu'un bouillon de cultures de vingt-quatre heures, alors que le nombre de bactéries par centimètre cube est beaucoup plus grand dans le deuxième cas que dans le premier ». Et Manil, qui par ailleurs a nié l'émission de toxines par les bactéries pathogènes des plantes (se basant sur les essais faits avec les filtres de culture *in vitro*), en conclut « au caractère particulièrement infectieux de l'extrait filtré sur papier, de feuilles malades », et à la présence, dans cet extrait, « de quelque chose qui augmente la virulence ».

Nous n'avons pu, nous-même, refaire cette expérience, venue à notre connaissance à la fin de la rédaction du présent travail. Nous la rapportons telle quelle, pensant qu'il est intéressant de la rapprocher des nôtres. Ne s'agirait-il pas, dans ces extraits de plantes, d'une lysine élaborée par la plante, et mettant en liberté les endotoxines des bactéries, qui, bien que Manil n'ait pas réussi à les mettre en évidence, sont peut-être un des moyens d'action de la bactérie pathogène pour la plante aussi bien que de celle pathogène pour l'animal?

Enfin, nous noterons également que Kostoff suggère la possibilité de la présence de lysines dans les tissus des bourrelets de greffe qu'il décrit comme le siège d'une importante formation d'anticorps. Il étaye son hypothèse par l'observation qu'il a faite relativement à l'accumulation des acides aminés dans les tissus de la greffe. Il est vrai que ce fait a été interprété de façon tout autre par Silberschmidt qui voit là tout simplement l'indice d'échanges lents et difficiles, surtout dans les cas où les deux organismes associés appartiennent à des espèces éloignées.



C — *Inoculation de cultures microbiennes à des animaux préparés par des anticorps végétaux spécifiques.*

Les expériences qui précèdent ont montré que des plantes, soumises à des inoculations répétées d'un microbe, ont élaboré des anticorps capables de modifier la virulence de ce microbe lorsqu'on les ajoute à des cultures de ce germe avant de les inoculer au cobaye.

Nous avons cherché à apporter une autre preuve de la pré-

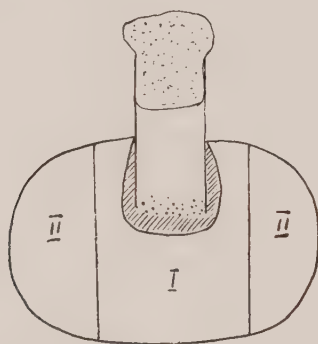


FIG. 3. — La zone hachurée, en contact immédiat avec l'inoculation de B. de Gärtner a été rejetée.

La zone II, trop loin de l'inoculum a également été rejetée.

La zone I seule a été conservée.

sence de ces anticorps dans les plantes inoculées. Pour cela, nous avons fait agir les extraits de plantes préparées, non plus sur les microbes au moment de l'inoculation aux cobayes, mais sur ceux-ci, avant l'injection du microbe d'épreuve. Nous avons, en conséquence, soumis les cobayes d'expérience à un traitement de longue durée (un mois ou un mois et demi) au cours duquel nous mêlions à leur nourriture les plantes préparées. L'animal ingérait les plantes que nous supposions contenir les anticorps. Si ces anticorps existaient, ils devaient être assimilés par l'organisme et pouvaient, au bout d'un temps de traitement assez long, s'être accumulés dans les tissus. L'animal, inoculé à ce moment avec le microbe d'épreuve, devait se comporter d'une façon différente de celle

de l'animal témoin qui n'avait pas reçu de plantes préparées.

Le matériel auquel nous nous sommes adressée se composait de pommes de terre inoculées de la façon que nous avons décrite plus haut, avec des cultures de B. de Gärtner. Une pomme de terre préparée, hâchée finement, était donnée en mélange avec la nourriture ordinaire un jour sur deux. La série de cobayes témoins recevait exactement le même régime alimentaire, mais la Pomme de terre préparée était remplacée par une Pomme de terre ordinaire. A la fin de ce traitement, chaque cobaye recevait, dans la veine, une certaine quantité de culture de B. de Gärtner (de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 5), suffisante pour amener sa mort. Les lésions constatées à l'autopsie sont enregistrées avec soin.

Nous avons fait deux séries d'expériences dont les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

EXPÉRIENCE N° 1. — Chaque cobaye d'expérience est nourri un jour sur deux d'une pâtée additionnée d'une Pomme de terre anti-Gärtner.

Les cobayes témoins reçoivent le même régime alimentaire, mais les Pommes de terre anti-Gärtner sont remplacées par des Pommes de terre normales.

A la fin du traitement, qui dure un mois, on inocule chaque cobaye avec une certaine quantité de culture de B. de Gärtner de vingt-quatre heures en bouillon Liebig (0 c. c. 10 à 0 c. c. 5).

EXPÉRIENCE N° 2. — Chaque cobaye d'expérience est nourri tous les deux jours d'une pâtée additionnée d'une Pomme de terre anti-Gärtner.

Chaque cobaye témoin reçoit le même régime alimentaire, mais la Pomme de terre anti-Gärtner est remplacée par une Pomme de terre ordinaire.

A la fin de ce traitement (qui dure un mois et demi), on inocule chaque cobaye avec une certaine quantité de suspension de B. de Gärtner (suspension dans 5 cent. cubes d'eau physiologique d'une culture de vingt-quatre heures de B. de Gärtner sur gélose en tube incliné). Les doses employées varient de 0 c. c. 1 à 1 c. c. 5.

L'examen des tableaux suivants indique que les symptômes pathologiques présentés par les cobayes traités par des plantes anti-Gärtner sont plus graves que ceux présentés par des cobayes qui ont été nourris de plantes normales.

Ce résultat se rapproche de celui auquel nous étions arrivée à l'issue des expériences conduites sur les plantes anti-

| CAS   | CENT. CUBES<br>de G. inoculé | MORT EN     | LÉSIONS RE                  |  |                     |
|---|------------------------------|-------------|-----------------------------|--|---------------------|
|   |                              |             | Péritoine                   | Intestin   | Foi                 |
| (Nourris de la ration normale)  |                              |             |                             |  |                     |
| I' . . . . .  | 0,1 (veine).                 | 40 jours.   |                             |  | Normal.             |
| II' . . . . .   | 0,25 (veine).                |             |                             |  |                     |
| III' . . . . .  | 0,25 (veine).                |             |                             |  |                     |
| IV' . . . . .   | 0,5 (veine).                 | 47 jours.   | Congestionné.               |  |                     |
| (Nourris de la ration normale additionnée)  |                              |             |                             |  |                     |
| I . . . . .   | 0,1                          | 1 mois.     | Congestionné.               |  | Périhépa            |
| II (guéri)  | 0,25                         | 3 semaines. |                             |  |                     |
| III (guéri)   | 0,25                         | 2 semaines. | Péritonite avec<br>liquide. |  |                     |
| IV . . . . .  | 0,5                          | 1 semaine.  |                             | Congestion. Matières<br>liquides dans l'in-<br>testin. | Congesti-<br>tense. |
| (1) Le signe + indique la présence de ganglions hypertrophiés. Le poids moyen d'un cobaye |                              |             |                             |  |                     |

Proteus, dont les extraits étaient inoculés au cobaye en mélange avec des cultures de *B. proteus*.

Nous avons alors constaté que l'inoculation du mélange (Proteus plus extrait de plantes préparées) est plus virulent, sauf de rares cas, que l'inoculation du mélange Proteus plus extrait de plantes normales. Tout se passait donc comme si la plante avait acquis la propriété d'augmenter la virulence de la culture de Proteus, et comme si l'hypothèse de Nicolle, relative à la présence de « lysines » prépondérantes dans la plupart des cas, était exacte.

L'expérience présente donne un résultat du même ordre. Le traitement par la Pomme de terre anti-Gärtner a « sensibilisé » le cobaye à des injections postérieures de ce microbe.

L'explication du mécanisme de cette sensibilisation ne peut être qu'hypothétique. Mais l'hypothèse qui semble la plus logique est celle qui nous a guidée dans tout notre travail : le

is.

OPSIE

| Rate                                 | Capsules surrénales | Hypertrophie des ganglions |        |           |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------------|--------|-----------|
|                                      |                     | mésentériques              | aines  | aisselles |
| année de Pommes de terre.)           |                     |                            |        |           |
|                                      |                     | +                          | ++ (1) |           |
|                                      | Congestionnées.     |                            | ++     | ++        |
| ence.<br>mes de terre anti-Gärtner.) |                     |                            |        |           |
|                                      |                     |                            | ++     | ++        |
| née, grosse.                         |                     | +                          | ++     |           |
| de volume<br>es conges-<br>ée.       |                     | ++                         | ++     |           |
| ammes.                               |                     |                            |        |           |

cobaye a absorbé et assimilé une certaine quantité d'anticorps élaborés par la plante. Ces anticorps seraient encore des anticorps lysants, mettant en liberté, dans l'organisme, les endotoxines microbiennes.

On pourrait, il est vrai, nous objecter que la « sensibilisation » du cobaye a été le fait de l'absorption, au cours du traitement, de quantités infinitésimales de toxines de Gärtner par l'organisme du cobaye. Ces toxines auraient provoqué des réactions d'allergie qui expliqueraient l'aggravation des symptômes observés.

Nous ne pensons pas que cette hypothèse soit acceptable. Les Pommes de terre données aux cobayes ont été soigneusement débarrassées de la zone du tubercule voisine du point d'inoculation où a été déposé le centimètre cube de culture de B. de Gärtner, puis lavées.

La partie que l'on a administrée au cobaye ne pouvait donc



| CAS  | CENT. CUBES<br>de G. inoculé | MORT EN   | LÉSIONS RELEVÉES            |                                       |                                |
|--|------------------------------|-----------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
|  |                              |           | Péritoine                   | Intestin                              | Foie                           |
| (Nourris de la ration normale)             |                              |           |                             |                                       |                                |
| I' . . . . .                               | 0,25 (veine).                |           |                             |                                       |                                |
| II' . . . . .                              | 0,5 (veine).                 | 10 jours. | Congestionné.               | Matières liquides<br>dans l'intestin. |                                |
| III' . . . . .                             | 1 (veine).                   | 6 jours.  |                             |                                       |                                |
| IV' . . . . .                              | 1,5                          | 4 jours.  | Congestionné.               |                                       | Vésicule vidée<br>hypertrophie |
| V' . . . . .                               | 1 (péritoine).               |           |                             |                                       |                                |
| (Nourris de la ration normale additionnée) |                              |           |                             |                                       |                                |
| I (guéri) . .                              | 0,25 (veine).                |           |                             |                                       |                                |
| II . . . . .                               | 0,5 (veine).                 | 9 jours.  | Congestionné.               | Matières liquides<br>dans l'intestin. | Vésicule hypertrophiée.        |
| III . . . . .                              | 1 (veine).                   | 1 jour.   | Péritonite avec<br>liquide. | Matières liquides<br>dans l'intestin. |                                |
| IV . . . . .                               | 1,5 (veine).                 | 1 jour.   | Péritonite avec<br>liquide. | Matières liquides<br>dans l'intestin. |                                |
| V . . . . .                                | 1 (péritoine).               | 12 jours. | Périssplénite.              |                                       |                                |

(1) Le signe + indique l'hypertrophie des ganglions. Le poids moyen des cobayes est de 400 grs.

(1) Le signe + indique l'hypertrophie des ganglions. Le poids moyen des cobayes est de 400 gr.

contenir aucun reste de bouillon de culture, ce qui est, d'ailleurs, démontré par l'absence d'agglutinines dans le sang du cobaye. Nous avons, en effet, recherché sur les cobayes traités (avant l'inoculation) la présence d'agglutinines. Les réactions ont été négatives et ne sont devenues positives qu'après l'inoculation de la culture de B. de Gärtner dans l'organisme du cobaye. On peut, tout au plus, admettre qu'il y a eu passage d'une certaine quantité de toxines microbiennes vers l'intérieur du tubercule. Mais, dans ce cas, les toxines, dans leurs passages successifs à travers les cellules, auraient sans doute subi une série de modifications. Rien ne permet de rejeter entièrement cette hypothèse, mais celle que nous proposons, en harmonie avec les faits observés dans d'autres expériences, nous semble avoir plus de chances d'être conforme à la réalité.

is et demi.

OPSIE

| Rate   | Capsules surrénales                | Hypertrophie des ganglions |        |           |
|--|------------------------------------|----------------------------|--------|-----------|
|  |                                    | mésentère                  | aines  | aisselles |
| <i>année de Pommes de terre).</i>            |                                    |                            |        |           |
|  | Très congestionnées.               |                            | ++ (4) |           |
| de volume,<br>estionnée.                     | Congestionnées.                    |                            | ++     |           |
| ée, grosse.                                  | Congestionnées.                    |                            | ++     |           |
| <i>ence.<br/>mes de terre anti-Gärtner).</i> |                                    |                            |        |           |
| ionnée.                                      |                                    |                            | ++     | ++        |
|  | Hypertrophie, con-<br>gestionnées. | +                          | ++     | ++        |
|  | Hypertrophie, con-<br>gestionnées. | +                          | ++     | ++        |
|  | Hypertrophie.                      |                            | ++     |           |

## B. — Étude des réactions des plantes vis-à-vis de toxines bactériennes.

*Étude par une méthode physiologique.  
(Inoculation à des cobayes  
de mélanges de cultures bactériennes  
et d'antitoxines végétales.)*

Après avoir constaté l'élaboration des anticorps par les plantes inoculées à l'aide de cultures bactériennes, ou croissant en milieux additionnés de ces cultures, nous avons recherché si la plante élabore encore des anticorps en réponse à l'inoculation de toxines bactériennes, ou à la présence de ces toxines dans le milieu où elle se développe. Dans ce but,

nous avons, dans la culture bactérienne, séparé par filtration les exotoxines, et nous avons soumis les plantes en expérience à leur action dans les conditions expérimentales que nous préciserons dans les pages suivantes. On sait que l'animal réagit à l'injection d'une toxine par la formation d'une antitoxine. En est-il de même pour la plante ?

DÉTAIL DE LA TECHNIQUE. — Des bulbes d'*Allium cepa* sont mis à croître au-dessus d'un cristalliseur rempli d'eau additionnée de cultures filtrées de B. de Gärtner (100 cent. cubes pour 4.500 cent. cubes d'eau). Ils sont soutenus par des anneaux de bois les empêchant d'être recouverts par l'eau.

Les cultures de B. de Gärtner employées sont des cultures de quarante-huit heures filtrées sur bougie L3.

La putréfaction du milieu (eau + culture filtrée de Gärtner) étant rapide, il est renouvelé souvent. A chaque changement, le cristalliseur, les anneaux de bois, et même, très rapidement, les bulbes, sont lavés à l'eau de Javel.

De plus, la croissance des racines d'*Allium cepa* dans un tel milieu est très mauvaise. Il s'ensuit que si on fait croître toujours les bulbes dans ces mêmes conditions, les racines avorteront complètement, et l'absorption sera réduite au minimum. Pour remédier à cet inconvénient, on fait croître les bulbes, par exemple, trois jours en eau additionnée de toxine, puis trois jours en eau distillée, trois jours en eau additionnée de toxines, etc. Dans ces conditions, les racines continuent à croître, inégalement d'ailleurs, et présentent une succession de zones allongées et renflées correspondant à des périodes de croissance normale ou retardée.

Chaque renflement correspond à l'arrêt de croissance qui se produit pendant la période où l'eau est additionnée de filtrat de culture de B. de Gärtner.

A la récolte (après trois semaines à un mois de culture dans de telles conditions), les bulbes sont lavés à l'eau distillée et les parties étudiées (feuilles, bulbes ou racines) sont coupées, broyées au pilon sur plaques de verre dépoli, mises à macérer en eau distillée, pressées. Le produit d'extraction est centrifugé, neutralisé, filtré sur bougie Chamberland L3.

C'est sur le liquide obtenu parfaitement clair et stérile que nous avons opéré la recherche des antitoxines.

Nous avons, dans ce but, utilisé une méthode biologique consistant à inoculer à des cobayes, soit des cultures en bouillon de B. de Gärtner seules, soit des mélanges à des taux variables de B. de Gärtner et d'extraits de plantes préparées ou non.

L'existence d'une antitoxine doit se traduire par une neutralisation de la toxine d'épreuve (l'exotoxine contenue dans la culture en bouillon de B. de Gärtner). Si elle se trouve dans l'extrait de plantes préparées, les symptômes présentés par les cobayes inoculés avec le mélange de B. de Gärtner et de cet extrait seront moins graves que ceux présentés par les cobayes témoins inoculés avec le B. de Gärtner seul, ou le B. de Gärtner additionné d'extrait de plantes témoins.

Nous avons donc inoculé 5 séries de cobayes :

Une première série reçoit, par tête, 5 cent. cubes de l'extrait de plantes préparées ;

Une deuxième série reçoit 5 cent. cubes de l'extrait de plantes normales (ces deux séries témoins sont faites à seule fin de nous assurer du caractère inoffensif de ces extraits employés seuls) ;

Une troisième série reçoit des quantités variables (0 c. c. 25 à 0 c. c. 5) de cultures de B. de Gärtner de vingt-quatre heures (mises à l'étuve à 37°) en bouillon Liebig. Ces cultures contiennent les corps microbiens et les exotoxines avec lesquelles nous avons préparé les pieds d'*Allium cepa* en expérience.

Une quatrième série témoin est inoculée avec des mélanges de cultures de B. de Gärtner et d'extraits de plantes normales (0 c. c. 25 à 0 c. c. 5 de B. de Gärtner en bouillon ; 0 c. c. 5 ou 5 cent. cubes d'extraits de plantes) ;

Une cinquième série, la série d'épreuve, est inoculée avec des mélanges de B. de Gärtner et d'extraits de plantes préparées (dans les mêmes proportions que dans la série précédente).

RÉSULTATS DE L'EXPÉRIENCE. — Il nous est difficile de présenter, dans un résumé concis, le résultat de nos expériences.

Tous nos cobayes sont morts, en effet, dans des délais de



six à sept jours, les témoins aussi bien que les animaux inoculés avec le mélange : microbe + extrait de plantes traitées.

Les lésions constatées à l'autopsie ont été, cependant, fort variables et toujours beaucoup moins étendues et moins considérables chez les cobayes d'expérience que chez les témoins.

Il semble que cet état de choses traduise une action réelle, mais incomplète d'une antitoxine, présente dans l'extrait d'oignon traité, sur la toxine injectée en même temps que lui. Cette action serait insuffisante pour protéger le cobaye, suffisante cependant pour limiter le développement des lésions organiques.

Nous avons, dans ces conditions, pensé pouvoir schématiser notre expérience de la façon suivante :

Nous avons attribué à chaque autopsie une valeur numérique obtenue en donnant une note à chaque lésion constatée : la diarrhée seule aura, par exemple, la note 1, la diarrhée hémorragique, la note 2, etc.

*Système de notation adopté :*

|  |       |
|--|-------|
| Ganglion normal . . . . .                                    | 0     |
| Ganglion légèrement hypertrophié . . . . .                   | 1     |
| Ganglion très hypertrophié . . . . .                         | 2     |
| Ganglion très hypertrophié et congestionné . . . . .         | 3     |
| Ganglion, hypertrophie et congestion considérables . . . . . | 4     |
| Diarrhée . . . . .   | 1     |
| Diarrhée hémorragique . . . . .                              | 2     |
| Vésicule biliaire rétractée, à parois épaisses . . . . .     | 2     |
| Vésicule biliaire d'aspect normal . . . . .                  | 0     |
| Péritonite . . . . .   | 3     |
| Rate, selon l'hypertrophie et la congestion . . . . .        | 1 à 3 |
| Plaques de Peyer hypertrophiées . . . . .                    | 2     |

Dans ces conditions, les cobayes sur lesquels nous avons expérimenté ont obtenu, à l'autopsie, les notes suivantes :

**Sujets témoins ayant reçu des inoculations de B. de Gärtner.**

*Durée de survie :*

*Dose inoculée :*

Cobaye mort en sept jours.

0 c.c. 25 de B. de Gärtner.

*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                   |                                    |          |
|-----------------------------------|------------------------------------|----------|
| Ganglions inguinaux . . . . .     | légèrement hypertrophiés . . .     | 1        |
| Ganglions axillaires . . . . .    | normaux . . . . .                  | 0        |
| Ganglions lombaires . . . . .     | normaux . . . . .                  | 0        |
| Ganglions mésentériques . . . . . | hypertrophiés . . . . .            | 2        |
| Péritoine . . . . .               | congestionné, liquide . . . . .    | 3        |
| Rate . . . . .                    | hypertrophiée, congestionnée . .   | 3        |
| Capsules surrénales . . . . .     | hypertrophiées, hémorragiques .    | 3        |
| Intestin . . . . .                | diarrhée . . . . .                 | 1        |
| Plaques de Peyer . . . . .        | hypertrophiées . . . . .           | 2        |
| Vésicule biliaire . . . . .       | vide, parois épaisses, rétractées. | 2        |
| Poumons . . . . .                 | normaux . . . . .                  | 0        |
|                                   |                                    | <hr/> 17 |

**Sujets témoins ayant reçu des inoculations de B. de Gärtner.**

*Durée de survie :*

*Dose inoculée :*

Cobaye mort en cinq jours.

0 c.c. 5 de B. de Gärtner.

*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                   |                                  |          |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------|
| Ganglions inguinaux . . . . .     | hypertrophiés . . . . .          | 2        |
| Ganglions axillaires . . . . .    | hypertrophiés . . . . .          | 2        |
| Ganglions lombaires . . . . .     | normaux . . . . .                | 0        |
| Ganglions mésentériques . . . . . | hypertrophiés, hémorragiques .   | 3        |
| Péritoine . . . . .               | un peu de liquide . . . . .      | 1        |
| Rate . . . . .                    | hypertrophiée, congestionnée . . | 3        |
| Capsules surrénales . . . . .     | normales . . . . .               | 0        |
| Intestin . . . . .                | normal . . . . .                 | 0        |
| Plaques de Peyer . . . . .        | hypertrophiées . . . . .         | 2        |
| Foie . . . . .                    | gras . . . . .                   | 0        |
| Vésicule biliaire . . . . .       | normale . . . . .                | 0        |
| Poumons . . . . .                 | pleurésie . . . . .              | 1        |
|                                   |                                  | <hr/> 14 |

**Sujets témoins ayant reçu des inoculations de B. de Gärtner.***Durée de survie :**Dose inoculée :*

Cobaye mort en six jours.

0 c.c. 25 de B. de Gärtner.

*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                   |   |          |
|-----------------------------------|---|----------|
| Ganglions inguinaux . . . . .     | légèrement hypertrophiés. . . .                       | 1        |
| Ganglions axillaires . . . . .    | normaux . . . . .                                     | 0        |
| Ganglions lombaires . . . . .     | normaux . . . . .                                     | 0        |
| Ganglions mésentériques . . . . . | très hypertrophiés, congestionnés.                    | 4        |
| Péritoine. . . . .                | congestion, liquide. . . . .                          | 3        |
| Rate. . . . .                     | hypertrophiée . . . . .                               | 2        |
| Capsules surrénales . . . . .     | hypertrophiées, mais pas hémor-<br>ragiques . . . . . | 2        |
| Intestin . . . . .                | diarrhée hémorragique. . . . .                        | 2        |
| Plaques de Peyer. . . . .         | normales . . . . .                                    | 0        |
| Vésicule biliaire . . . . .       | vide, à parois épaisses, rétractées.                  | 2        |
| Poumons. . . . .                  | normaux. . . . .                                      | 0        |
|                                   |   | <hr/> 16 |

**Sujets témoins ayant reçu des inoculations de mélange de culture de B. de Gärtner et d'extrait d'*Allium cepa* non traité.***Durée de survie :**Dose inoculée :*

Cobaye mort en quatre jours.

0 c.c. 5 de B. de Gärtner + 0 c.c. 5  
d'extrait d'*Allium cepa* non traité.*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                  |  |          |
|----------------------------------|--|----------|
| Ganglions inguinaux. . . . .     | congestionnés . . . . .                          | 3        |
| Ganglions axillaires . . . . .   | congestionnés . . . . .                          | 3        |
| Ganglions mésentériques. . . . . | hypertrophiés, congestionnés. :                  | 3        |
| Ganglions lombaires . . . . .    | normaux. . . . .                                 | 0        |
| Péritoine. . . . .               | congestionné. . . . .                            | 1        |
| Rate. . . . .                    | très congestionnée . . . . .                     | 2        |
| Capsules surrénales . . . . .    | congestionnées. . . . .                          | 3        |
| Intestin . . . . .               | normal. . . . .                                  | 0        |
| Plaques de Peyer. . . . .        | hypertrophiées, congestionnées.                  | 2        |
| Vésicule biliaire . . . . .      | rétractée, à parois épaisses. . .                | 2        |
| Poumons. . . . .                 | congestionnés, un peu de pleu-<br>résie. . . . . | 1        |
|                                  |  | <hr/> 20 |

**Sujets témoins ayant reçu des inoculations de mélanges  
de culture de B. de Gärtner et d'extrait d'*Allium cepa* non traité.**

*Durée de survie :*

*Dose inoculée :*

Cobaye mort en trois jours.

0 c.c. 5 de B. de Gärtner + 5 cent. cubes  
d'extrait d'*Allium cepa* normal.

*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                   |                                  |   |
|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| Ganglions inguinaux . . . . .     | hémorragiques (deux côtés) . . . | 3 |
| Ganglions axillaires . . . . .    | normaux . . . . .                | 0 |
| Ganglions lombaires . . . . .     | normaux . . . . .                | 0 |
| Ganglions mésentériques . . . . . | hypertrophiés, hémorragiques . . | 3 |
| Péritoine . . . . .               | un peu congestionné . . . . .    | 1 |
| Rate . . . . .                    | hypertrophiée, congestionnée . . | 3 |
| Capsules surrénales . . . . .     | normales . . . . .               | 0 |
| Intestin . . . . .                | diarrhée . . . . .               | 1 |
| Plaques de Peyer . . . . .        | hémorragiques . . . . .          | 2 |
| Vésicule biliaire . . . . .       | normale . . . . .                | 0 |
| Poumons . . . . .                 | normaux . . . . .                | 0 |

13

**Sujets témoins ayant reçu des inoculations de mélanges  
de culture de B. de Gärtner et d'extrait d'*Allium cepa* non traité.**

*Durée de survie :*

*Dose inoculée :*

Cobaye mort en sept jours.

0 c.c. 25 de B. de Gärtner + 0 c.c. 5  
d'extrait d'*Allium cepa* normal.

*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                |   |   |
|--------------------------------|---|---|
| Ganglions inguinaux . . . . .  | dans les deux aisselles congestionnés . . | 2 |
| Ganglions axillaires . . . . . | dans les deux aisselles . . . . .         | 2 |
| Ganglions lombaires . . . . .  | hypertrophiés . . . . .                   | 2 |
| Péritoine . . . . .            | normal . . . . .                          | 0 |
| Rate . . . . .                 | hypertrophiée, congestionnée . .          | 3 |
| Capsules surrénales . . . . .  | hypertrophiées . . . . .                  | 2 |
| Intestin . . . . .             | normal . . . . .                          | 0 |
| Plaques de Peyer . . . . .     | hypertrophiées . . . . .                  | 2 |
| Vésicule biliaire . . . . .    | vide, à parois épaisses rétractées .      | 2 |
| Poumons . . . . .              | normaux . . . . .                         | 0 |

15



**Sujets d'expérience ayant reçu des inoculations de mélanges  
de B. de Gärtner et d'extrait d'*Allium cepa* préparé.**

*Durée de survie :*

*Mélange inoculé :*

Cobaye mort en quatre jours.

0 c. c. 5 de B. de Gärtner + 5 cent. cubes  
d'extrait d'*Allium cepa* préparé.

*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                  |                                    |         |
|----------------------------------|------------------------------------|---------|
| Ganglions inguinaux. . . . .     | hémorragiques, pas très gros . . . | 3'      |
| Ganglions axillaires . . . . .   | légèrement hypertrophiés . . . .   | 1       |
| Ganglions lombaires . . . . .    | normaux . . . . .                  | 0       |
| Ganglions mésentériques. . . . . | légèrement hypertrophiés . . . .   | 1       |
| Péritoine. . . . .               | normal . . . . .                   | 0       |
| Rate. . . . .                    | hypertrophiée, congestionnée . . . | 3       |
| Capsules surrénales . . . . .    | normales . . . . .                 | 0       |
| Intestin . . . . .               | normal . . . . .                   | 0       |
| Plaques de Peyer. . . . .        | normales . . . . .                 | 0       |
| Vésicule biliaire . . . . .      | normale. . . . .                   | 0       |
| Poumons. . . . .                 | normaux . . . . .                  | 0       |
|                                  |                                    | <hr/> 8 |

**Sujets d'expérience ayant reçu des inoculations de mélanges  
de culture de B. de Gärtner et d'extrait d'*Allium cepa* préparé.**

*Durée de survie :*

*Mélange inoculé :*

Cobaye mort en six jours.

0 c. c. 5 de B. de Gärtner + 0 c. c. 5  
d'extrait d'*Allium cepa* préparé.

*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                  |                               |         |
|----------------------------------|-------------------------------|---------|
| Ganglions inguinaux. . . . .     | normaux . . . . .             | 0       |
| Ganglions axillaires . . . . .   | normaux . . . . .             | 0       |
| Ganglions lombaires . . . . .    | normaux . . . . .             | 0       |
| Ganglions mésentériques. . . . . | normaux . . . . .             | 0       |
| Péritoine. . . . .               |                               |         |
| Rate. . . . .                    | légère hypertrophie . . . . . | 1       |
| Capsules surrénales . . . . .    | normales . . . . .            | 0       |
| Intestin . . . . .               | un peu de diarrhée. . . . .   | 1       |
| Plaques de Peyer. . . . .        | normales . . . . .            | 0       |
| Vésicule biliaire . . . . .      | normale . . . . .             | 0       |
| Poumons. . . . .                 | normaux . . . . .             | 0       |
|                                  |                               | <hr/> 2 |

**Sujets d'expérience ayant reçu des inoculations de mélanges de culture de B. de Gärtner et d'extrait d'*Allium cepa* préparé.**

*Durée de survie :*

*Mélange inoculé*

Cobaye mort en sept jours.

0 c. c. 25 de B. de Gärtner + 5 cent. cubes d'extrait d'*Allium cepa* préparé.

*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                   |                                    |   |
|-----------------------------------|------------------------------------|---|
| Ganglions inguinaux . . . . .     | normaux . . . . .                  | 0 |
| Ganglions axillaires . . . . .    | normaux . . . . .                  | 0 |
| Ganglions lombaires . . . . .     | normaux . . . . .                  | 0 |
| Ganglions mésentériques . . . . . | légèrement hypertrophiés . . . . . | 1 |
| Péritoine . . . . .               | normal . . . . .                   | 0 |
| Rate . . . . .                    | congestionnée . . . . .            | 2 |
| Capsules surrénales . . . . .     | normales . . . . .                 | 0 |
| Intestin . . . . .                | normal . . . . .                   | 0 |
| Plaques de Peyer . . . . .        | normales . . . . .                 | 0 |
| Vésicule biliaire . . . . .       | normale . . . . .                  | 0 |
| Poumons . . . . .                 | normaux . . . . .                  | 0 |
|                                   |                                    | 3 |

**Sujets d'expérience ayant reçu des inoculations de mélanges de culture de B. de Gärtner et d'extrait d'*Allium cepa* préparé.**

*Durée de survie :*

*Mélange inoculé ;*

Cobaye mort en six jours.

0 c. c. 25 de B. de Gärtner + 0 c. c. 5 d'extrait d'*Allium cepa* préparé.

*Résultats de l'autopsie :*

NOTE

|                                   |   |    |
|-----------------------------------|---|----|
| Ganglions inguinaux . . . . .     | normaux . . . . .                                 | 0  |
| Ganglions axillaires . . . . .    | normaux . . . . .                                 | 0  |
| Ganglions lombaires . . . . .     | légèrement hypertrophiés . . . . .                | 1  |
| Ganglions mésentériques . . . . . | normaux . . . . .                                 | 0  |
| Péritoine . . . . .               | normal . . . . .                                  | 0  |
| Rate . . . . .                    | légèrement hypertrophiée, congestionnée . . . . . | 2  |
| Capsules surrénales . . . . .     | hypertrophiées, hémorragiques . . . . .           | 3  |
| Intestin . . . . .                | lésions hémorragiques . . . . .                   | 2  |
| Plaques de Peyer . . . . .        | nombreuses, hypertrophiées . . . . .              | 2  |
| Vésicule biliaire . . . . .       | normale . . . . .                                 | 0  |
| Poumons . . . . .                 | normaux . . . . .                                 | 0  |
|                                   |   | 10 |

**Pouvoir protecteur de la plante antitoxine-Gärtner  
(exprimé par un indice numérique).**

| COBAYES TÉMOINS                       |                         |   |  | COBAYES D'EXPÉRIENCE  |
|---------------------------------------|-------------------------|---|--|---|
| Cobayes<br>inoculés avec des extraits |                         | Cobayes<br>inoculés<br>avec B. de Gärtner | Cobayes<br>inoculés avec le mélange<br>culture B. de Gärtner<br>+ extrait de plantes<br>normales | Cobayes inoculés<br>avec le mélange<br>culture B. de Gärtner<br>+ extrait de plantes<br>préparées |
| de plantes<br>normales                | de plantes<br>préparées |   |  |   |
| 5 c.c. : 0.                           | 5 c.c. : 0.             | 0 c.c. 25 G. : 16.                        | 0 c.c. 25 G. + 0 c.c. 5<br>extrait : 15.   | 0 c.c. 25 G. + 0 c.c. 5<br>extrait : 10.  |
| 5 c.c. : 0.                           | 5 c.c. : 0.             | 0 c.c. 25 G. : 17.                        |  | 0 c.c. 25 G. + 5 c.c.<br>extrait : 3.   |
| 5 c.c. : 0.                           | 5 c.c. : 0.             | 0 c.c. 5 G. : 14.                         | 0 c.c. 5 G. + 0 c.c. 5<br>extrait : 20.  | 0 c.c. 5 G. + 0 c.c. 5<br>extrait : 1.  |
| 5 c.c. : 0.                           | 5 c.c. : 0.             |   | 0 c.c. 5 G. + 5 c.c.<br>extrait : 13.  | 0 c.c. 5 G. + 5 c.c.<br>extrait : 8.  |

Les symptômes pathologiques présentés par les cobayes après inoculation de B. de Gärtner et exprimés par les indices numériques que nous avons calculés de la façon indiquée plus haut, sont atténués si l'on inocule, en mélange avec les cultures bactériennes, l'extrait de plantes traitées. L'extrait de plantes normales ne possède pas cette propriété protectrice.

Les plantes croissant en milieux additionnés de toxines bactériennes élaborent donc des substances qui ont un rôle protecteur quand on les inocule en même temps que la toxine à des animaux de laboratoire : elles fabriquent des antitoxines.

**C. — Étude des réactions  
de la plante à des inoculations d'ovalbumine.**

*Recherche des anticorps élaborés  
par les plantes sous l'action d'une albumine étrangère.*

On connaît, en biologie animale, les réactions d'anticorps consécutives aux inoculations d'albumines. Les expériences suivantes démontrent que les mêmes phénomènes se passent

chez les végétaux et que dans l'extrait d'une plante préparée par inoculation d'albumine d'œuf, on peut mettre en évidence l'existence de précipitines pour l'ovalbumine.

PRÉPARATION DU MATÉRIEL. — Nous nous sommes adressée à l'*Allium cepa*, que nous avons mis à croître au-dessus de verres remplis d'eau distillée additionnée de blanc d'œuf battu avec deux fois son volume d'eau (15 cent. cubes d'eau distillée pour 15 cent. cubes de blanc d'œuf dilué au 1/3). On ajoute une goutte de formol à 40 p. 100 dans chaque verre pour éviter la putréfaction.

Une série témoin d'*Allium cepa* est mise à croître en eau distillée additionnée également d'une goutte de formol.

C'est de cette façon que nous avons résolu le problème de l'inoculation d'une albumine étrangère à une plante. L'expérience nous avait, en effet, montré précédemment qu'une plante était capable d'élaborer un anticorps sous l'action d'un antigène abondant dans le milieu où elle croît. Nous avons, par contre, obtenu des résultats nuls si nous essayions d'introduire, par traumatisme (dans la feuille d'*Allium cepa* ou dans la tige de *Vicia faba*) des solutions d'ovalbumine. On se souvient que Kostoff et Silberschmidt ont résolu la difficulté d'une autre façon, en considérant que les albumines étrangères du greffon constituaient pour le porte-greffe un véritable antigène susceptible de provoquer la formation d'anticorps. Cette dernière technique nous ayant semblé trop aléatoire, nous nous sommes adressée à celle que nous décrivons ici.

EXPÉRIENCE DE PRÉCIPITATION. — *Antigène* : blanc d'œuf dilué au 1/3 en eau distillée.

*Anticorps* : Extrait d'*Allium cepa* total, obtenu par broyage de la plante entière (sauf les bulbes), suivi de macération en eau distillée; filtration sur bougie Chamberland L3.

On ajoute à l'antigène quelques gouttes de l'extrait des plantes mises en expérience. Nous avons opéré la réaction aux dilutions suivantes :

|  |      |
|--|------|
| XVI gouttes de dilution de blanc d'œuf, IV gouttes d'extrait de plantes . . . . .                | 1/5  |
| XVIII gouttes de dilution de blanc d'œuf, II gouttes d'extrait de plantes . . . . .              | 1/10 |
| XIX gouttes de dilution de blanc d'œuf, I goutte d'extrait de plantes . . . . .                  | 1/20 |
| XVIII gouttes de dilution de blanc d'œuf, II gouttes d'extrait de plantes dilué au 1/5 . . . . . | 1/50 |



*Résultats de l'expérience :*

| DILUTIONS DES EXTRAITS   | 1/5 | 1/10 | 1/20 | 1/50 |
|--|-----|------|------|------|
| Réaction faite avec les extraits de plantes<br>témoins . . . . .   | —   | —    | —    | —    |
| Réaction faite avec les extraits de plantes<br>préparées . . . . . | ++  | +    | +    | —    |

Le résultat de cette expérience montre l'apparition, dans le suc de la plante croissant en milieu additionné de blanc d'œuf, de substances capables de précipiter l'ovalbumine en solution.

## II. — MISE EN ŒUVRE DES ANTICORPS ÉLABORÉS PAR LA PLANTE

### *1° Altération d'un germe au cours d'un séjour dans les tissus végétaux; 2° Défense des épidermes végétaux.*

#### MODIFICATION DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES D'UN GERME AU COURS DE SON SÉJOUR DANS LES TISSUS VÉGÉTAUX.

Nous avons été amenée, au cours de notre étude, à envisager comme probable, une action de la plante sur l'antigène microbien qu'on lui injecte. Nous avons cherché à préciser la nature de cette action dans les expériences suivantes. Elles ont eu pour but de chercher à mettre en évidence les modifications des propriétés physiques et biologiques des microbes qui ont séjourné un certain temps dans la plante. Nous avons, dans ce but, isolé des germes microbiens d'une plante à laquelle ils avaient été inoculés quelque temps auparavant et étudié les différentes caractéristiques de ces germes.

Dans le cas de B. de Gärtner (que nous avons injecté à *Solanum tuberosum* et à *Vicia faba*), l'isolement a toujours été très facile. Quelques germes saprophytes existant à la surface de la plante ou dans l'eau d'arrosage peuvent pénétrer parfois dans les plaies d'inoculation et se développer à côté du germe inoculé, mais ils sont peu nombreux.

Les souches de B. de Gärtner isolées ont présenté à peu de chose près, en culture, les mêmes caractères que la souche que nous avons inoculée à la plante. Elles produisaient seulement parfois une acidification plus rapide du milieu de Barsiekow glucosé. Leur virulence a, au contraire, été considérablement modifiée. Ceci ressort des expériences suivantes :

Nous avons opéré trois séries d'inoculation avec les souches de B. de Gärtner ayant subi ou non un séjour dans les tissus végétaux :

*Série I.* — Inoculation dans la veine, de quatre cobayes, avec les souches ci-dessous :

Souche I : B. de Gärtner entretenu sur gélose au bouillon Liebig.

Souches *a*, *b*, *c*, isolées de tubercules de *Solanum tuberosum* dans lesquels elles ont séjourné deux mois.

Le cobaye inoculé avec la souche I meurt après sept jours.

Le cobaye inoculé avec la souche *a* meurt après huit jours.

Le cobaye inoculé avec la souche *b* meurt après huit jours.

Le cobaye inoculé avec la souche *c* meurt après quinze jours.

*Série II.* — Inoculation de quatre cobayes dans le péritoine avec les souches employées dans l'expérience précédente :

Le cobaye inoculé avec la souche I meurt après douze jours.

Le cobaye inoculé avec la souche *a* ne meurt pas.

Le cobaye inoculé avec la souche *b* ne meurt pas.

Le cobaye inoculé avec la souche *c* meurt après trois semaines.

*Série III.* — Inoculation de quatre cobayes dans le péritoine avec les souches suivantes :

Souche I : B. de Gärtner entretenu sur gélose au bouillon Liebig.

Souches *a*, *b*, *c*, isolées de *Vicia faba* dans lequel elles ont séjourné seulement dix jours.

Le cobaye inoculé avec la souche I meurt en dix-sept jours.

Le cobaye inoculé avec la souche *a* meurt en dix-sept jours.

Le cobaye inoculé avec la souche *b* meurt en dix-sept jours.

Le cobaye inoculé avec la souche *c* ne meurt pas.

Les résultats précédents indiquent que certaines souches de B. de Gärtner, isolées de plantes vivantes dans lesquelles elles

ont séjourné, ont perdu de leur virulence (souche *a* et *b* des deux premières séries d'expériences, souche *c* de la troisième série).

La diminution de virulence s'observe mieux dans la deuxième série d'expériences que dans la première : c'est que l'inoculation dans une veine amène, en général, dans un délai très court, des troubles plus importants que ceux observés à la suite d'injections intrapéritonéales, et les différences de virulence des souches apparaissent de façon moins sensible.

Dans la troisième série, le germe a séjourné trop peu de temps dans les tissus de la plante pour qu'une grande différence puisse s'observer entre la virulence de la souche type et celle de la souche isolée.

Nous rapportons cette expérience (qui nous a été suggérée par des travaux analogues de Hans Much) pour montrer l'action que peut exercer une plante sur un germe microbien qui ne lui est pas pathogène. Nous ignorons s'il s'agit là d'une résistance passive (milieu de croissance défavorable, principe antiseptique) ou active (sécrétion d'anticorps contre le germe bactérien). Il semble cependant que la plante réponde à l'agression d'un microbe, même avant la formation d'anticorps, et exerce sur celui-ci une action au moment du premier contact. C'est sans doute une action de même nature qui s'exerce sur le microbe saprophyte déposé à la surface d'un épiderme végétal dont nous allons voir la pauvreté constante en germes microbiens.

#### DÉFENSE DES ÉPIDERMES VÉGÉTAUX.

Nous ajouterons aux expériences citées précédemment les observations suivantes qui sont intéressantes parce qu'elles se rapprochent d'observations analogues faites en pathologie animale. Il s'agit de la défense spontanée des épidermes végétaux qui semble se faire de façon aussi active que celle des épidermes animaux.

L'origine de cette observation remonte à un essai que nous avons fait, de cultiver quelques espèces microbiennes sapro-

phytes communément rencontrées sur les végétaux. Nous nous étions adressée pour isoler ces souches, à des branches d'Aucuba croissant dans le jardin de l'Institut Pasteur de Lille, donc exposées à toutes les fumées et poussières d'une ville industrielle. Nous nous attendions à une récolte abondante de bactéries.

Or, le nombre de germes vivants existant à la surface des rameaux était remarquablement peu élevé. En fait, la plupart des tubes de gélose au bouillon de Liebig ensemencés avec un fil de platine promené à la surface des rameaux, restaient stériles. On obtenait de temps en temps le développement d'une moisissure, plus rarement, celui d'une colonie bactérienne.

Si, de même, on plongeait tel quel un fragment de branche verte d'Aucuba dans un tube de bouillon Liebig, le bouillon ne se troublait pas, ou seulement après plusieurs jours de séjour à l'étuve à 37°. La plupart du temps, d'ailleurs, les seuls organismes qui se développaient étaient des champignons, peut-être parasites, qui semblaient croître à partir des tissus intérieurs de la tige.

La surface des jeunes branches d'Aucuba était pratiquement stérile. Cette constatation nous surprit. La première explication qui nous vint à l'esprit fut celle de l'existence d'un antiseptique dans les tissus végétaux de l'Aucuba. Mais la même expérience répétée avec des branchettes jeunes d'un autre arbuste croissant à côté, donnèrent des résultats identiques. L'antiseptique, s'il existait, n'était donc pas spécial à l'Aucuba.

Pour savoir s'il s'agissait d'un antiseptique, nous avons étudié l'effet de fragments de branches vertes d'aucubas, ou d'extraits de la même plante, sur des bouillons ensemencés avec des cultures bactériennes. Nous n'avons observé aucune modification dans le développement de la bactérie, si ce n'est, parfois, un léger retard.

Aucune action, ni antiseptique, ni empêchante, ne semblait s'être manifestée au cours de notre expérience.

Nous avons, de plus, remarqué que si l'on faisait avec l'anse de platine, des prélèvements sur des tissus morts de l'arbuste,



le nombre des germes vivants présents sur les tissus de liège était beaucoup plus élevé que dans le cas du prélèvement fait sur des tissus jeunes.

Nous basant sur ces constatations, nous avons fait l'expérience suivante :

*Plante d'expérience : la Pomme de terre.*

Nous nous sommes assurée que le même phénomène existait dans le cas d'un tubercule de Pomme de terre.

Un tubercule de Pomme de terre (tubercule jeune de l'année) est lavé, puis abandonné sur une table du laboratoire pendant plusieurs jours. Au bout de quatre à six jours, on prend le tubercule, on l'immerge dans de l'eau stérile (quantité juste suffisante pour le recouvrir). On compte en boîte de Petri, le nombre de germes bactériens contenus dans chaque centimètre cube d'eau de lavage.

Ce nombre est toujours minime : entre 20 et 100 par exemple.

Nous avons opéré de même la numération des germes bactériens à la surface de la Pomme de terre soumise à divers traitements. Voici les résultats :

*PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Tubercule de Pomme de terre lavé non pelé :* Après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire : 40 germes au centimètre cube d'eau de lavage.

*Tubercule de Pomme de terre lavé pelé :* Après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire : 35 germes au centimètre cube d'eau de lavage.

*Tubercule de Pomme de terre cuit non pelé* (sans qu'il ait été défait par la cuisson) : Après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire : 400 germes au centimètre cube d'eau de lavage.

*Tubercule de Pomme de terre cuit pelé :* Après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire : au moins 80.000 germes.

*Tubercule de Pomme de terre haché* (après avoir été pelé) : Après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire : environ 80.000 germes.

*Pelure de tubercule de Pomme de terre hachée :* Après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire : environ 100.000 germes.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — *Tubercule de Pomme de terre épluché à deux reprises* : (en enlevant, une première fois, l'épiderme, puis ensuite 0 cent. 5 d'épaisseur de tissus de réserve).

Au moment de l'épluchage : 800 germes au centimètre cube d'eau de lavage.

Après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire : 1.000 germes au centimètre cube d'eau de lavage.

*Pelure extérieure de la Pomme de terre (épiderme)* : Au moment de l'épluchage, 1.000 germes au centimètre cube d'eau de lavage.

Après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire : 64.000 germes au centimètre cube d'eau de lavage.

*Pelure intérieure de la Pomme de terre* : Après vingt-quatre heures de séjour au laboratoire, 3.000 germes au centimètre cube d'eau de lavage.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — On prend une Pomme de terre que l'on coupe en tranches minces (0 cent. 5).

*Tranche I* : laissée crue, exposée vingt-quatre heures à l'air du laboratoire. Après vingt-quatre heures : nombre de germes au centimètre cube d'eau de lavage : 4.000 germes.

*Tranche II* : cuite (sans qu'elle se défasse) puis laissée au laboratoire. Après vingt-quatre heures : 12.000 germes.

*Tranche III* : frappée fortement plusieurs fois au pilon. Après vingt-quatre heures : 80.000 germes.

QUATRIÈME EXPÉRIENCE. — On prend un Oignon cru, épluché et lavé. On le plonge dans une dilution de *B. proteus* dans l'eau salée (60.000 germes par centimètre cube).

On plonge dans la même dilution, un Oignon cuit (sans qu'il se défasse, mais les cellules de la tunique extérieure sont tuées). On fait la numération des germes à la surface de ces deux Oignons après dix jours de séjour au laboratoire :

*Oignon cru* : Nombre de germes de *B. proteus* au centimètre cube d'eau de lavage : 1.200 germes.

*Oignon cuit* : Nombre de germes au centimètre cube d'eau de lavage : plus de 100.000.

De ces observations, se dégagent les conclusions suivantes :  
La surface épidermique des tissus végétaux vivants héberge

généralement peu de germes bactériens vivants, alors que les tissus ou matériaux morts qui les entourent en sont recouverts abondamment.

Il s'agit là d'un phénomène de défense de la plante vivante. Si, en effet, pour une raison quelconque, les cellules superficielles sont tuées (par la chaleur, par exemple), le nombre de germes bactériens augmente. Si la vitalité est diminuée (coups répétés portés sur la plante qui, pourtant, n'ont pas tué les cellules), le nombre de germes augmente également. C'est le cas de la pomme qui pourrit si elle reçoit un choc.

Certains tissus de vitalité moins grande que d'autres (les tissus constitués de liège, l'écorce du tubercule de Pomme de terre, par exemple) se laissent plus rapidement recouvrir de germes étrangers que les tissus constitués de cellules à protoplasme plus abondant (tissus de réserve de l'intérieur du tubercule de Pomme de terre). Cette défense semble donc s'exercer en proportion de la vitalité du tissu qui l'exerce.

Ce n'est pas un simple manque de nourriture qui fait que les germes sont peu abondants sur les tissus vivants. Ils sont, en effet, plus abondants sur des objets inertes à côté des plantes vivantes, plus abondants sur des tissus de liège que sur des tissus en croissance.

Nous ne pouvons pas déterminer la nature de ce mode de défense. Mais il est intéressant de noter qu'il existe de façon exactement semblable chez les animaux. Il est facile de se rendre compte qu'un épiderme quelconque exposé à l'air libre, celui de la main par exemple, après simple lavage à l'eau bouillie est très pauvre en germes.

L'épiderme, dans le cas de la plante, comme dans le cas de l'animal, n'est pas une simple barrière passive. Chaque cellule de cet épiderme est active et oppose une défense à tout germe qui tombe à sa surface, non pas seulement du fait qu'elle possède un revêtement cuticulaire plus abondant que les autres cellules de l'organisme, mais parce qu'elle possède un protoplasme vivant.

# CONCLUSIONS

Depuis 1932, époque à laquelle nous avons commencé ce travail, un grand nombre de publications ont paru sur le sujet, publications contradictoires qui indiquent la complexité du problème. Nous apportons quelques résultats positifs et des techniques originales qui pourraient être utilisées plus largement dans des travaux futurs. Les résultats positifs de quelques expériences nous permettent, non pas de répondre à toutes les questions que soulève notre sujet, mais d'élaborer le plan d'un travail futur auquel ces expériences serviront de base. Chacune d'elles est en réalité le début d'un chapitre encore inexploré.

Pour notre travail, nous nous sommes placée dans des conditions évidemment artificielles : les plantes ont été inoculées avec des bactéries qui, dans les conditions ordinaires, ne leur sont pas pathogènes. Mais nous avons pensé qu'un germe n'avait pas besoin d'être pathogène pour une plante, pour que celle-ci réagisse à son action : « Dans l'immunité type, écrit Maurice Nicolle, la destruction s'opère silencieusement », mais la réaction existe néanmoins. Et « la virulence du microbe, c'est son immunité vis-à-vis de l'organisme, comme l'immunité de ce dernier, c'est sa virulence vis-à-vis du microbe ». L'expérience nous a prouvé qu'en effet, les réactions d'immunité se développaient contre des germes vis-à-vis desquels la plante est immune. Après avoir constaté qu'effectivement les plantes présentaient des réactions humorales dans les conditions de croissance et d'infection que nous avions fixées, nous avons continué à travailler dans la même voie et avec le même matériel. Nous n'avons pas encore pu aborder, ou seulement très peu, l'étude de cas naturels d'immunité.

Les seules expériences que nous présentons ici ne nous permettent pas de tirer des conclusions générales quant au mécanisme de l'immunité chez les végétaux. Elles sont cependant suffisantes pour nous donner une idée des changements qui apparaissent dans les « humeurs » de la plante et accompagnent les réactions d'immunité. Nous avons vu que l'extrait cellulaire (tel que nous l'obtenons par broyage ou macération



des organes végétaux) n'a pas des propriétés identiques quand il provient d'une plante infectée et quand il a été prélevé sur une plante saine. Couleur, densité, stabilité, acidité, etc.... sont différentes d'un extrait à un autre. En utilisant des techniques délicates, nous pourrions mettre en lumière l'influence qu'ils exercent sur les germes inoculés aux plantes dont ils proviennent et obtenir ainsi des indications sur le rôle, dans le mécanisme de l'immunité, des propriétés acquises par ces extraits végétaux. C'est ce que nous avons essayé de faire en employant les techniques utilisées en sérologie humaine (agglutination, précipitation, déviation du complément, etc...) ou en étudiant les propriétés biologiques de nos extraits par inoculation à des animaux de laboratoire. Nous avons obtenu aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, des résultats qui, en dépit d'une certaine inconstance, nous ont apporté des certitudes.

Cette irrégularité apparente des phénomènes ne doit pas nous surprendre. Il serait, en réalité, étonnant qu'il en fût autrement. Tout nous est inconnu dans ce domaine des réactions d'immunité chez la plante : l'ampleur des phénomènes de résistance cellulaire autour du point d'inoculation, la rapidité de leur apparition, leur persistance, l'importance du mode d'administration des antigènes (Maurice Nicolle insiste, en sérologie animale, sur l'importance de ce dernier point quant à la prédominance des phénomènes de lyse ou de coagulation), le meilleur moyen d'extraction du suc cellulaire contenant les anticorps (ceux-ci sont-ils en solution dans le suc vacuolaire ou fixés sur quelque colloïde du protoplasme), leur stabilité, etc...

De plus, les techniques sérologiques telles qu'on les emploie en pathologie animale sont encore bien imparfaites. Elles ne permettent de saisir le phénomène que de façon empirique. On perçoit les effets des substances nouvelles apparues dans le suc cellulaire : on ne connaît ni leur nature, ni leur origine. Nous les avons nommées des « anticorps », employant le terme consacré en biologie animale. Tout se passe comme s'ils comprenaient deux groupes : les anticorps agglutinants ou coagulants, et les anticorps lysants, tout comme ceux que les pathologistes connaissent. La première catégorie serait responsable des phénomènes d'agglutination observés *in vitro*, la seconde,

de nombreux phénomènes d'activation, de virulence, mis en évidence par inoculation sur les cobayes. Mais nous ne savons rien de la nature de ces substances : s'il n'en existe qu'une possédant cette pluralité de propriétés ou s'il y en a plusieurs, chacune possédant une propriété propre. On ne sait même pas si elles constituent véritablement des armes de défense de l'organisme végétal ou si « ces substances ou ces propriétés des sérums ne constituent, dans bien des cas, que des témoins de l'immunité ».

Il se peut même que la cellule végétale, lorsqu'elle opère la destruction du germe qui l'a envahie, agisse bien par coagulation suivie de lyse (c'est en fait ce que montre la morphologie : les pelotons de *Rhizoctonia* subissent dans la cellule d'orchidée une véritable agglutination, selon l'expression de Noël Bernard ; et les filaments des champignons endophytes subissent une protéolyse lorsque les cellules corticales s'affranchissent de la symbiose). Mais rien ne démontre que ce soient ces mêmes substances que nous décelons *in vitro*.

Il est vrai que le même doute existe en sérologie et nous avons bien le droit de rapprocher les deux groupes de phénomènes : propriétés acquises des sérums animaux et propriétés acquises des extraits de végétaux infectés. Notre travail nous a toujours amenée à un rapprochement entre les comportements de la cellule végétale et ceux de la cellule animale.

Ce qui caractérise la plante : son squelette de cellulose, sa nutrition purement minérale, l'indépendance relative de chacun de ses membres, semble, à première vue, la différencier tellement de l'animal qu'on a peine à comprendre que ses réactions devant un parasite ressemblent à celles de l'animal.

Mais le squelette de cellulose ne protège pas la plante contre les attaques des champignons capables de sécréter des enzymes lysant la cellulose ; chaque partie de la plante est relativement indépendante d'une autre ; il s'ensuivra que sa réaction pourra être plus localisée, intéresser une partie plus restreinte de l'organisme ; ainsi, dans le règne végétal, comme dans le règne animal, la réaction d'immunité sera, en dernière analyse, une réaction cellulaire. Rien d'étonnant à ce que l'on puisse trouver un caractère commun à quelques-unes de ces réactions.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU *COHNISTREPTOTHRIX ISRAELI* (PINOY, 1911)

PAR GEORGES SP. JOANNIDÈS.

(Institut Pasteur d'Athènes.)

Pinoy [1], en décrivant le *Streptothrix israeli* (Kruse, 1896) a créé le genre *Cohnistreptothrix* pour les Actinomycètes (Hyphomycètes microsiphonnés) qui, à l'encontre des *Euactinomyces* n'offrent en culture qu'un développement maigre, vivent en anaérobies, ne produisent que des formes bacillaires ou coccobacillaires sans filaments typiques et sans spores, ne résistent pas au chauffage à 55° pendant vingt minutes et ne sont, le plus souvent, pas repiquables si l'âge des cultures dépasse un mois.

Plusieurs auteurs comme Castellani et Chalmers [2], Brumpt [3], Langeron [4], Perin [5], Magrou [6], et autres, ont suivi la classification de Pinoy. Mais d'autres n'ont pas accepté cette définition, ni en ce qui concerne la place de ce germe dans la classification botanique, ni en ce qui concerne ses caractères. Ainsi, Lieske [7] a soutenu l'opinion que ses caractères ne suffisent pas pour séparer les *Cohnistreptothrix* des *Euactinomyces*, parce que, selon lui, la production de filaments et de spores, ainsi que la vitalité et l'aéro- ou l'anaérobiose, dépendent des conditions de culture et de l'adaptation de ces germes. Cet auteur ne reconnaît qu'un genre indistinct, le genre *Actinomyces*. Radtke [8], acceptant les idées de Scheel [9], et, un peu plus tard, Haupt et Zeki [10] classent le *Cohnistreptothrix israeli* parmi les Corynébactéries, tandis qu'Orskov [11] place les Corynébactéries et les Mycobactéries dans le groupe II b de sa classification des Actinomycètes, groupe qui comprend les *Cohnistreptothrix* de Pinoy. Notons que Lehmann et Neumann [12] avaient, dès 1896, réuni tous

les Actinomycètes, le genre *Corynebacterium* et le genre *Mycobacterium* dans un groupe spécial et citent ces germes comme Hyphomycètes voisins des Schizomycètes et parfois confondus avec eux. Enfin, M<sup>lle</sup> O. Grootten [13], s'appuyant sur le fait que le mycélium des Actinomycètes ne présente pas de noyaux morphologiquement définis, tient tous les Actinomycètes pour des bactéries et place le groupe des *Actinomycetales* au voisinage des *Mycobactériales*. M<sup>lle</sup> Grootten, suivant la classification de 1920 du Comité de la Société des bactériologistes américains, laisse le genre *Actinomyces* indivisé et décrit le germe en question sous le nom *Actinomyces israeli*. De même, dans le *Manuel de Bactériologie*, de Bergey [14], l'ordre des *Actinomycetales* est constitué par la famille des *Actinomycetaceæ* (qui comprend, entre autres, le genre *Actinomyces* indivisé) et par la famille des *Mycobacteriaceæ*, qui comprend aussi les Corynébactéries.

Par contre, Nannizzi [15] range parmi les champignons toute la classe des Actinomycètes constituée par l'ordre des *Actinomycetales*. Cet ordre est divisé en famille des *Actinomycetaceæ* et en famille des *Mycobacteriaceæ*, cette dernière comprenant aussi les Corynébactéries. Parmi les autres genres de la famille des *Actinomycetaceæ*, Nannizzi place le genre *Actinobacterium* Haass 1906 (sensa Sampietro 1908), qui comprend deux espèces : l'*Actinobacterium israeli* (Kruse) Sampietro 1908 (c'est-à-dire le *Cohnistreptothrix* Pinoy 1911) et l'*Actinobacterium israeli*, var. *spitzii* (Lignières), Sampietro 1908. Notons que, dès 1929, Ciferri et Redaelli [16] rangeaient le *Cohnistreptothrix israeli* dans le genre *Actinobacterium* et en faisaient l'espèce type de ce genre.

Pour Negroni [17], le *Cohnistreptothrix israeli* appartient, d'accord avec la classification de Jensen (1931), au genre *Proactinomyces* et son nom serait *Proactinomyces israeli*.

Pareille divergence d'opinions est aussi à signaler dans la description des caractères du *Cohnistreptothrix israeli*. Plusieurs auteurs ne donnent pas à ce genre les caractères fixés par Pinoy. Lieske ne sépare pas le type aérobie Bostrom du type anaérobie Wolff-Israël, et admet qu'il s'agit du même germe différemment adapté. Schlegel [18] confond aussi les



deux types. Dans le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, aucune mention du type Wolff-Israël n'est faite, et seul le type Bostroem est cité, caractérisé comme « aerobie and microaerophilie ». Henrici [49], qui distingue le type anaérobie d'Israël, donne quelques caractères cultureux prêtant à confusion, et écrit que, « après un ou deux repiquages, on peut obtenir un maigre développement sur des cultures aérobies et que, quelquefois, le germe pousse, dès les cultures initiales d'isolement, dans des conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose ». Vuillemin [20] écrit que cette espèce n'est pas strictement anaérobie, que les cultures en sont difficiles, et il rapporte que Landrieu n'a réussi qu'une culture et que le champignon ne poussait qu'en surface.

Enfin, quant à la conservation des souches, le germe est généralement tenu comme très fragile, et Henrici écrit qu'il est très difficile de conserver des cultures vivantes. M<sup>lle</sup> Grooten a trouvé que les cultures âgées de trois semaines perdent la facilité de se reproduire et elle a réussi à entretenir ses souches vivantes pendant trois mois.

\*  
\* \*

Ayant isolé deux souches de *Cohnistreptothrix israeli* en 1927 [21], deux autres en 1931 [22] et une cinquième en 1932, nous les conservons toutes à l'Institut Pasteur d'Athènes.

Pour la première culture, c'est-à-dire la culture d'isolement, le milieu le meilleur et le plus pratique nous a paru être la gélose molle amidonnée, additionnée de 5 p. 1.000 de glycérine et recouverte d'huile de vaseline. Il est vrai que la condition essentielle de succès est de travailler avec du matériel aussi pur que possible, c'est-à-dire avec des grains obtenus au cours de l'opération, émulsionnés dans du bouillon glucosé et ensemencés par piqûre à l'aide d'une pipette Pasteur. Pour les cultures ultérieures et pour la conservation des souches, au lieu de glycérine, nous ajoutons, à la gélose molle, 2 p. 1.000 de glucose, qui donne des cultures un peu plus riches. Il n'est pas indispensable de recouvrir la gélose molle d'huile de vaseline. Les repiquages doivent être faits tous les dix à quinze jours à l'aide d'une pipette Pasteur.

En suivant nos cultures pendant des années, nous n'avons pas vu nos souches devenir aérobies. Elles ne poussent pas à la surface de la gélose molle. La culture commence à 1 centimètre environ de la surface et devient plus riche vers le fond du tube. Les cultures, reensemencées à la surface de milieux solides, ne poussent pas (1).

La résistance des cultures au chauffage est restée immuable. Le chauffage à 55°, pendant vingt minutes, suffit pour tuer les cultures.

Quant à la vitalité des cultures, le maximum de survie que nous ayons constaté après plusieurs mois de repiquages est de quarante-six jours. Ainsi donc, le repiquage des cultures pendant des mois a augmenté la vitalité du germe, et cela sans changement de la morphologie et sans production de spores.

Nos souches transportées en gélose Veillon, donnent toujours les colonies typiques, blanches et cunéiformes. En bouillon glucosé, elles donnent de petites granulations blanchâtres au fond du tube. La vitalité de ces cultures sur gélose Veillon et sur bouillon ne dépasse pas vingt-neuf jours. Ainsi donc, l'augmentation de la vitalité des cultures, ci-dessus signalée, paraît dépendre de l'adaptation du germe à la gélose molle.

Pour étudier au microscope la morphologie du germe en colonie, il faut cultiver le *Cohnistreptothrix israeli* dans le vide sur des boîtes de Petri contenant une mince couche de milieu solide. Le procédé d'Orskov (culture sur des boîtes de Petri sous une lamelle), sans faire le vide, n'a pas suffi, entre nos mains, pour assurer la culture.

Pour étudier la morphologie du germe cultivé sur gélose molle, nous préparons un assez grand nombre de cultures, en ensemençant au fil de platine par piqûre. Ce procédé d'ensemencement échoue assez souvent, mais en cas de succès (la culture commence à paraître vers le début du 3<sup>e</sup> jour (2),

(1) M<sup>lle</sup> Grootten, travaillant sur d'autres milieux, s'est trouvée obligée de réensemencer ses cultures tous les six à huit jours.

(2) M<sup>lle</sup> Grootten, travaillant sur d'autres milieux, a vu le *Cohnistreptothrix israeli* pousser à la première culture d'isolement vers le sixième ou le huitième jour et, après plusieurs repiquages, vers le quatrième ou le sixième jour.

il donne des préparations qui ne contiennent pas de germes vieux provenant de la semence, ce qui pourrait arriver en cas d'ensemencement par pipette). On obtient des préparations fraîches en mettant à l'aide d'une pipette Pasteur une goutte de culture entre lame et lamelle.

En suivant ainsi les cultures jour par jour, jusqu'au cinquième jour, on a l'impression qu'il s'agit d'une culture de corynébactérie. Mais, dès le sixième jour, l'aspect commence à changer. On trouve des éléments plus longs, d'autres qui présentent une ébauche de ramification monopodiale typique. De plus, quand on tombe sur un amas de germes, on a l'impression nette qu'il s'agit d'un plexus mycélien fragmenté. Cet aspect devient de plus en plus frappant avec l'âge des cultures.

Après avoir examiné les préparations fraîches, on peut en faire des frottis. Mais il faut prendre les précautions suivantes :

a) Ne garder pour le frottis que la partie de la goutte qui représente vraiment la culture, et ne pas l'écraser brutalement ;

b) Laisser la préparation sécher pendant quarante-huit heures. Malgré ces précautions, quand on colore au Gram, on voit très souvent se détacher la meilleure partie de la préparation. L'examen microscopique de ces frottis renforce l'aspect déjà donné par les préparations fraîches, et montre encore des renflements terminaux claviformes qui, dans les cultures assez âgées (du vingtième jour et plus), peuvent rappeler les massues rencontrées dans les grains actinomycosiques des tissus. Notons que, dernièrement, Gibson [23], travaillant avec un autre germe, la *Nocardia splenica* (Gibson, 1930), a trouvé dans les cultures des renflements identiques aux massues des grains. Pour Gibson, il s'agirait de formes d'involution analogues à celles qu'on peut constater chez les Phycomycètes.

Ainsi, notre expérience personnelle nous conduit à tirer les conclusions suivantes :

a) Que le *Cohnistreptothrix israeli* est une espèce à caractères bien distincts et stables ;

b) Que l'isolement et la conservation des souches sur gélose molle amidonnée et glucosée est facile ;

c) Que le repiquage des souches pendant des années n'a eu d'influence que sur la vitalité du germe qui se trouve augmentée (cultures sur gélose molle), sans changement de la morphologie et sans production de spores ;

d) Qu'il n'y a aucune raison pour faire entrer le *Cohnistrep-tothrix israeli* dans le genre *Corynebacterium*. L'acceptation du germe *Actinobacterium*, même si elle ne doit être que provisoire, donne une solution au problème de la classification du *Cohnistrep-tothrix israeli*, qui est plus proche des autres *Actinomycetaceæ* que ne l'est le genre *Corynebacterium* ;

e) Qu'il est inadmissible de faire entrer le *Cohnistrep-tothrix israeli* dans le genre *Actinomyces* laissé indivisé. Les caractères de ce genre présentent vis-à-vis des caractères génériques des *Actinomyces*, des différences fondamentales qui ne permettent pas cette simplification dans la classification botanique de ces micro-organismes.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] PINOY (E.). *Bull. Institut Pasteur*, **11**, 1913, p. 929 et 977.
- [2] CASTELLANI (A.), et CHALMERS (A.). *Manual of Tropical Medicine*. 2<sup>e</sup> éd., 1913, et 3<sup>e</sup> éd., 1919, Baillière, Tindall and Cox, London.
- [3] BRUMPT (E.). *Précis de Parasitologie*, 3<sup>e</sup> éd., 1922, et 4<sup>e</sup> éd., 1927, Masson, Paris.
- [4] LANGERON (M.). Les Oosporoses, dans le *Nouveau Traité de Médecine*, fasc. 4, 2<sup>e</sup> éd., 1925, Masson, Paris.
- [5] PERIN (A.). *Le micosi polmonari*, Libr. Editrice Senese, Siena, 1925.
- [6] MAGROU (M.). *Cours de Bactériologie de l'Institut Pasteur de Paris*. 1928, 41<sup>e</sup> leçon : Streptothricées.
- [7] LIESKE (R.). *Morphologie und Biologie der Strahlenpilze*, Verl. Bornträger, Leipzig, 1921.
- [8] RADTKE. *Beiträge zur Ätiologie der Aktinomykose des Rindes, mit besonderer Berücksichtigung der Kieferaktinomykose*, Dissert. Leipzig, 1931 (cité par Haupt et Zeki).
- [9] SCHEEL (R.). *Beitrag zur Ätiologie der Kieferaktinomykose des Rindes*, Vet. Med. Dissert., Berlin, 1910 (cité par Haupt et Zeki).
- [10] HAUPT (H.) et ZEKI. *Zbt. f. Bakter. I. Originale*, **130**, 1933, p. 91.
- [11] ORSKOV (J.). *Investigations into the morphology of the Ray-fungi*, Levin et Munksgaard, Copenhagen, 1923.



- [12] LEHMANN et NEUMANN. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie*, 2<sup>e</sup> édit., Munich, 1896.
- [13] GROOTTEN (O.). *Ces Annales*, **53**, 1934, p. 311.
- [14] BERGEY'S. *Manuel of Determinative Bacteriology*. 3<sup>e</sup> édit., 1930, et 4<sup>e</sup> édit., 1934, Baillière, Tindall and Cox, Londres.
- [15] NANNIZZI (A.). *Ripertorio sistematico dei micetti dell uomo e degli animali*, S. A. Poligraphica Maini, Siena, 1934.
- [16] CIFERRI (R.) et REDAELLI (P.). *Boll. dell'Istit. Sieroter. Milanese* **8**, 1929, p. 587.
- [17] NEGRONI (P.). *C. R. Soc. de Biologie*. **117**, 1934, p. 1239.
- [18] SCHLEGEL (M.). *Strahlenpilzkrankheit, Aktinomykose*, In : Kollé-Wassermann's Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen, **5**, 3<sup>e</sup> édit., Fischer, Jena, 1928.
- [19] HENRICI (A.). *Molds, Yeasts and Actinomycetes*, Wiley, New-York, et Chapuan et Hall, Londres, 1930.
- [20] VUILLEMIN (P.). *Les champignons parasites et les mycoses de l'homme*, Lechevalier, Paris, 1931.
- [21] BLANC (G.), CAMINOPETROS (I.) et JOANNIDES (G.). *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, **21**, 1928, p. 432.
- [22] JOANNIDES (G.), PAPAGEORGIOU (S.) et M<sup>llo</sup> ANGELO (A.). *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, **24**, 1931, p. 432.
- [23] GIBSON (J. B. H.). *J. Path.*, **39**, 1934, p. 533 (analysé in *Ztbl. f. Bakteriol., I. Ref.*, **117**, 1935, p. 491).

# ANALYSE DE LA TOXINE DYSENTÉRIQUE A L'AIDE DE LA RÉACTION DE FLOCCULATION

(TROISIÈME COMMUNICATION)

par K. HALAPINE.

(*Section d'Epidémiologie  
de l'Institut de Médecine expérimentale.  
Directeur : P. ZDRODOVSKI.*)

La réaction de flocculation présente un grand intérêt non seulement comme méthode de titrage des sérums antidy-sentériques, mais encore, au point de vue théorique, elle permet de prévoir la structure de l'antigène et de l'anticorps et d'expliquer certaines réactions de l'immunité.

Il y a un an, en étudiant la récupération de l'anatoxine diphtérique en même temps que son pouvoir immunisant, nous avons émis une hypothèse sur la structure de la toxine diphtérique : celle-ci serait composée de fractions à valeur antigène inégale suivant qu'elles sont liées à tel ou tel complexe protéique.

La flocculation du filtrat dysentérique avec le sérum correspondant montre des zones multiples que nous avons regardées comme résultant de l'action des parties constituantes différenciées de la toxine sur des fractions bien définies du sérum, c'est-à-dire que nous avons adopté l'hypothèse de la structure complexe à plusieurs fractions de la toxine dysentérique. Nous avons essayé de trouver un appui à cette supposition en cherchant à isoler ces fractions en partant des zones de flocculation qu'elles provoquent.

L'expérience peut être regardée comme réussie en ce qui concerne la fraction de la toxine qui correspond à la troisième zone de flocculation.

Le fait suivant nous a suggéré l'idée de l'expérience en

étudiant la stabilité de la toxine dysentérique. Nous avons constaté dans notre laboratoire (D<sup>r</sup> L. Bazilevskaia), que certains filtrats de cultures dysentériques jeunes (de quarante-huit heures) portés à 100°, donnent un précipité. Le filtrat, débarrassé de ce précipité, présente une seule zone de floculation qui correspond à la troisième zone du mélange toxine-sérum ; le titre évalué par la floculation initiale reste le même. Ce filtrat est complètement atoxique et ne possède aucun pouvoir immunisant. Le sérum d'un cheval, immunisé avec le filtrat pendant deux mois, flocculait seulement dans la troisième zone. Ce sérum ne préservait pas l'animal de l'intoxication, le mélange flocculant n'était pas neutre : il tuait les lapins en huit à dix heures. Ainsi, en immunisant le cheval avec un antigène ne présentant qu'une seule fraction, nous avons obtenu un sérum à une seule zone de floculation ; ce sérum, absolument spécifique par rapport à l'antigène qui l'a engendré, était dépourvu, nous l'avons déjà mentionné, de tout pouvoir préservant.

Il nous a été impossible d'isoler les fractions de la toxine qui provoquent la deuxième et la première zone de floculation.

Notre tentative de séparer ces fractions à l'aide de la précipitation fractionnée avec du sulfate d'ammonium a échoué. En précipitant la toxine dysentérique avec différentes quantités de sulfate d'ammonium (30 à 75 p. 100), nous avons toujours vu apparaître les trois zones de floculation dans les mélanges de sérum et les différents précipités redissous.

Or, comme nous croyons (nous basant sur notre hypothèse de travail) que la structure de l'anticorps reflète celle de l'antigène, nous avons supposé que la précipitation fractionnée d'un sérum à trois zones par le sel donnerait un résultat pareil à celui que nous avons obtenu avec la toxine. En effet, le précipité obtenu avec 30 p. 100 de  $\text{SO}_4 (\text{AzH}_4)_2$ , et redissous, présentait une floculation double correspondant aux troisième et deuxième zones. Les mélanges à floculation initiale de deux zones n'étaient pas neutres ; les lapins injectés avec le mélange flocculant de la deuxième zone ont succombé le deuxième jour ; ceux injectés avec le mélange de la troisième zone, le septième jour. On peut donc supposer que la substance précipitée par 30 p. 100 de sulfate ne pré-

sente pas de pouvoir préservant bien accusé. Le précipité obtenu par addition de 30 à 40 p. 100 de sel et redissous, flocculait dans trois zones dont les titres se rapprochaient beaucoup de ceux du sérum non précipité. Les lapins injectés avec le mélange flocculant de la deuxième zone ont survécu ; ceux qui ont reçu le mélange flocculant de la première zone ont succombé du deuxième au troisième jour. 40 à 50 p. 100 de sulfate d'ammonium donnaient un précipité, lequel, redissous, flocculait dans deux zones correspondant à la première et deuxième zone : la flocculation initiale exigeait cependant des quantités plus grandes de sérum ; l'épreuve de la neutralisation donnait des résultats analogues aux précédents.

Donc la disjonction des fractions de sérum aussi bien que celle des parties constituantes du filtrat, n'est pas possible par la précipitation fractionnée.

Les expériences ont, de plus, montré que le pouvoir antitoxique de différentes fractions de sérum n'est pas identique.

En recherchant les méthodes qui puissent nous aider à dissocier les substances complexes, tels la toxine et le sérum, nous avons pensé à l'adsorption spécifique. Nous avons saturé la toxine successivement avec les quantités de sérum correspondant à la dose flocculante initiale, en commençant par la première zone.

Ces essais ont été couronnés de succès. Le tableau I représente le protocole de cette expérience.

Nous y voyons d'abord la flocculation triple dans les mélanges de la toxine N° 31 avec différentes quantités d'un sérum à 3 zones ; ensuite, la flocculation du filtrat N° 1, après la précipitation de la première fraction qui correspond à la première zone de flocculation, et enfin la flocculation du N° 2, après la précipitation de la deuxième fraction dans le filtrat N° 1.

La toxicité du filtrat dysentérique (toxine) avant l'adsorption de la première fraction était égale à 100 DLM, après l'adsorption elle n'était plus que 20 DLM ; dans le dernier filtrat, elle était égale à 0.

Ainsi, cette expérience montre que, de toute évidence, l'antigène dysentérique présente une structure complexe, comprenant plusieurs fractions différenciées à toxicité diffé-



rente. La fraction principale d'un filtrat à 3 fractions, celle que nous avons dénommée la première, contient les  $\frac{4}{5}$  de la toxicité générale.

TABLEAU I. — Adsorption spécifique.

| QUANTITÉ DE SÉRUM<br>dilué 1 : 5 | TOXINE<br>dose 3 cent. cubes | FILTRAT<br>n° 1 | FILTRAT<br>n° 2 |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
| 1,5. . . . .                     | +                            | +               | +               |
| 1,4. . . . .                     | +                            | +               | +               |
| 1,3. . . . .                     | +                            | +               | +               |
| 1,2. . . . .                     | +                            | +               | +               |
| 1,1. . . . .                     | »                            | »               | +               |
| 1,0. . . . .                     | »                            | »               | +               |
| 0,9. . . . .                     | »                            | »               | +               |
| 0,8. . . . .                     | »                            | »               | »               |
| 0,7. . . . .                     | »                            | »               | »               |
| 0,6. . . . .                     | »                            | »               | »               |
| 0,5. . . . .                     | »                            | »               | »               |
| 0,4. . . . .                     | »                            | »               | »               |
| 0,3. . . . .                     | +                            | +               | »               |
| 0,25. . . . .                    | +                            | +               | »               |
| 0,2. . . . .                     | +                            | +               | »               |
| 0,1. . . . .                     | »                            | »               | »               |
| 0,09. . . . .                    | »                            | »               | »               |
| 0,08. . . . .                    | »                            | »               | »               |
| 0,07. . . . .                    | »                            | »               | »               |
| 0,06. . . . .                    | »                            | »               | »               |
| 0,05. . . . .                    | »                            | »               | »               |
| 0,04. . . . .                    | »                            | »               | »               |
| 0,03. . . . .                    | +                            | »               | »               |
| 0,02. . . . .                    | »                            | »               | »               |
| 0,01. . . . .                    | »                            | »               | »               |
| Toxicité (souris), en DLM. . .   | 100                          | 20              | 0               |

*Remarque :* 1° Filtrat n° 1, après adsorption avec une quantité de sérum correspondant à la dose floculante initiale de la première zone; 2° filtrat n° 2, après adsorption avec une quantité de sérum correspondant à la dose floculante initiale de la deuxième zone.

Ainsi, la méthode de l'adsorption spécifique permettant de différencier dans la toxine plusieurs fractions, la possibilité d'isoler par chauffage la fraction correspondant à la troisième zone, le fait que durant l'immunisation avec un antigène à 3 fractions, un sérum à double floculation se transforme en sérum à 3 zones de floculation, tous ces faits semblent confirmer notre hypothèse sur la structure complexe de la toxine dysentérique.

La toxine dysentérique peut donc être considérée comme une combinaison complexe, comprenant des substances diverses, bien différenciées, à structure physico-chimique, et aux propriétés biologiques distinctes.

L'immunisation avec un pareil antigène entraîne la formation d'anticorps spécifiques correspondant à chaque fraction d'antigène. Il s'ensuit que la réaction de floculation reflète, d'une part, la structure de l'antigène (toxine), et, d'autre part, celle de l'anticorps (sérum). Dans notre conception, la réaction de floculation permet de considérer le sérum spécifique comme un réactif biologique, lequel, suivant le degré de sa différenciation, reflète plus ou moins complètement la structure de l'antigène correspondant. Ce réactif ne peut être représenté

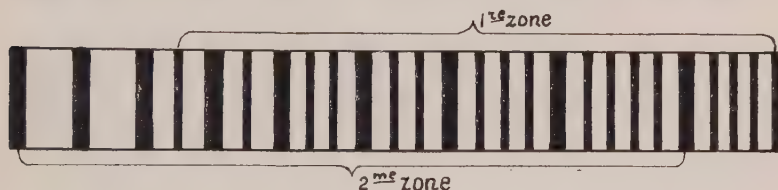


FIG. 1.

que par un sérum très différencié, le sérum à trois zones de floculation.

La figure 1 est une image schématique du filtrat n° 31, suivant que celui-ci est floculé par un sérum à 2 ou à 3 zones de floculation.

Le filtrat dysentérique y est représenté par un spectre, dont les bandes correspondent aux différentes fractions du filtrat. Il est évident qu'un sérum à trois zones de floculation peut différencier dans le filtrat trois fractions, un sérum à double floculation n'en décelant que deux. Il est donc d'une grande importance de pouvoir différencier par un sérum à 3 zones la principale fraction de la toxine, celle qui est la plus active au point de vue du pouvoir antigène. Un sérum à double floculation reste dans ces conditions en défaut.

En représentant la structure des toxines dysentériques sous forme d'un spectre où les produits du métabolisme et de l'autolyse bactérienne se différencient en trois fractions [dont la

plus dispersée correspond à la première fraction (1)], essayons d'expliquer les phénomènes que nous avons observés en étudiant les préparations dysentériques.

La figure 2 représente la floculation de plusieurs toxines dysentériques avec le même sérum à 3 zones de floculation (N° 111, 1.500 A.E.). On y voit combien est difficile le choix de 2 toxines à structure absolument égale. Peut-être la dispersion différente de ces 3 fractions détermine-t-elle les oscillations des doses floculantes, illustrant ainsi la diversité de la structure des toxines dysentériques.

Analysons maintenant la toxicité de ces différentes fractions telle qu'elle se présente dans la floculation avec un sérum à 3 zones floculantes. La détermination du pouvoir toxique ré-

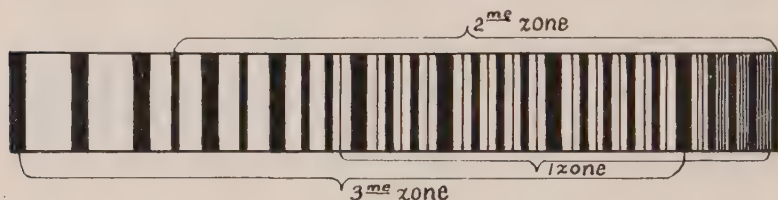


FIG. 2.

siduel *in vivo* après l'adsorption spécifique montre que le filtrat est d'autant plus toxique qu'on se rapproche de la première zone de floculation, correspondant à la fraction la plus dispersée de l'antigène. La troisième fraction du filtrat (troisième zone floculante) est dépourvue de toxicité. Ceci est démontré par le fait qu'un filtrat où la première et la deuxième fraction sont éliminées par adsorption, est complètement atoxique et flocule dans la troisième zone présentant le même titre qu'avant l'adsorption.

Le pouvoir toxique de la deuxième fraction du filtrat est bien marqué, il atteint son maximum dans la première fraction qui détient les  $\frac{4}{5}$  de la toxicité totale.

(1) La précipitation fractionnée avec le sulfate d'ammonium a montré que la première zone commence à floculer lorsqu'on précipite un sérum à 3 zones avec 30 à 40 p. 100 de sulfate, c'est-à-dire au moment où sont précipitées les pseudoglobulines, fraction la plus dispersée parmi les globulines.

Ces données permettent de supposer que les propriétés toxiques du filtrat augmentent avec la désagrégation (jusqu'à une certaine limite) des complexes formant les produits du métabolisme cellulaire.

L'étude de l'action de la chaleur sur les filtrats montre que ceux-ci deviennent plus stables à mesure que la dose floculante augmente, c'est-à-dire que la fraction la moins dispersée de la toxine résiste le mieux à la température. C'est ainsi qu'en chauffant la toxine à 3 fractions (série 46) pendant une demi-heure à 60°, 70°, 80° et 100° C., nous avons constaté que la première fraction était la plus labile. Après chauffage à 60°, la floculation retardait de soixante-douze heures ; elle n'apparaissait plus après chauffage à 70°. La toxicité du filtrat chauffé à 60° restait intacte. Le filtrat chauffé à 70° ne gardait qu'un sixième du pouvoir toxique de départ.

La deuxième fraction (deuxième zone) supportait mieux le chauffage à 60° ; le titre et la vitesse de floculation ne variant pas, le chauffage à 70° ne provoquait que quelques heures de retard dans la floculation. Après un chauffage à 80°, la toxine ne floculait plus et perdait toute sa toxicité.

La troisième fraction s'est montrée la plus stable : la dose floculante restait invariable même après chauffage à 80° et 100° C. La différente stabilité des 3 fractions du filtrat dysentérique par rapport à la température tient probablement à la différence des propriétés biophysiques du filtrat. Peut-être l'étude des colloïdes du sérum et de la toxine jettera-t-elle quelque lumière dans cette question si complexe de la structure de l'antigène et de l'anticorps.

Nous avons déjà mentionné ailleurs (voir notre deuxième mémoire) que la première fraction du filtrat, celle qui correspond à la première zone de la floculation, garde mieux son titre après l'addition du formol, tandis que celui de la deuxième fraction (deuxième zone) baisse de moitié et même plus. Nous avons mis ce phénomène sur le compte de la labilité de la deuxième fraction.

Actuellement, nous croyons que la première fraction de l'antigène, plus dispersée, et, par conséquent plus active, se combine plus facilement au formol, se désintoxique plus vite et devient plus thermostable ; la deuxième fraction, plus sta-



ble et moins active, est plus lente à s'unir au formol, perd difficilement sa toxicité et résiste moins à la chaleur; le séjour prolongé à 40° à l'étuve la dénature, ce qui est démontré par la diminution du titre flocculant.

Les variations régulières de la toxicité et de la thermostabilité des toxines une fois établies, nous avons recherché si, en faisant flocculer les filtrats avec un sérum à 3 zones de flocculation, nous arriverons à constater les variations dans leur pouvoir immunisant.

L'étude du pouvoir immunisant de plusieurs toxines et des anatoxines correspondantes a montré que la première fraction est la plus active; c'est elle qui joue le rôle prépondérant dans la formation de l'antitoxine. Les toxines et les anatoxines dont le pouvoir antigène était le plus marqué demandaient, pour flocculer avec notre sérum étalon (série III), des doses variant de 0 c. c. 08 à 0 c. c. 05 d'une dilution à 1/5. On peut se faire une idée des propriétés immunisantes de la deuxième fraction en comparant l'effet immunisant d'une toxine à 2 fractions avec l'action d'une toxine (ou antitoxine) à 3 fractions (les doses flocculantes de la première zone du premier filtrat à 2 zones étant égales aux doses flocculantes de la deuxième zone du second à 3 zones). Les résultats de l'immunisation avec de tels filtrats à 2 zones (séries 21, 51) ont montré que leur pouvoir immunisant est plus faible au point de vue de la formation de l'antitoxine (titre 400 à 500 A.E.).

La troisième fraction ne joue aucun rôle dans la formation de l'antitoxine.

En parlant de la qualité des anatoxines (deuxième mémoire), nous avons mentionné que le pouvoir immunisant des filtrats à 3 zones augmente en même temps que diminue la dose de sérum qui fait flocculer la deuxième fraction de la toxine, ce qui fait que, quelquefois, la flocculation de la deuxième zone se rapproche de la première (tableau III, série 11).

L'exactitude de cette supposition d'ailleurs prouvée dans la pratique de l'immunisation, confirme notre hypothèse sur la structure complexe de l'antigène dysentérique, celui-ci étant constitué par une série d'antigènes secondaires en quelque sorte antagonistes, se faisant concurrence entre eux. Plus la

première et la deuxième zone sont éloignées l'une de l'autre, plus grande est la différence dans la structure physico-chimique des antigènes, plus leur antagonisme est prononcé et moins sont bons les résultats de l'immunisation. Plus les zones de floculation se rapprochent, plus les antigènes se ressemblent, moins est marquée la concurrence entre ses fractions, ce qui, à son tour, augmente la production de l'antitoxine.

Considérant le filtrat dysentérique comme un complexe de différents antigènes, il est logiquement impossible de déterminer son pouvoir immunisant par un étalon unique.

L'unité antigénique (U. A.) évaluée par la floculation, ne suffit pas pour caractériser le filtrat dysentérique, même quand l'unité est évaluée séparément pour la première et la deuxième zone. Les filtrats à grand nombre d'unités ont souvent un pouvoir immunisant très faible, tandis que ceux qui présentent moins d'unités sont d'excellents antigènes.

Donc, pour les antigènes complexes, comme le sont les filtrats bactériens, l'unité antigène, déterminée par la floculation, n'a pas de valeur absolue et ne peut pas servir à caractériser une toxine. Ceci est évident pour les filtrats dysentériques.

L'hypothèse que nous avons émise sur la structure des filtrats diphtériques (1933) a pu être étendue aux toxines dysentériques; elle a rendu plus clairs les phénomènes quelquefois contradictoires auxquels on se heurte dans l'étude des filtrats dysentériques.

#### CONCLUSIONS.

1° Notre hypothèse sur la structure complexe de la toxine diphtérique (plusieurs fractions) et sur les différences qualitatives qui existent entre ses fractions (1933), a pu également être appliquée aux filtrats dysentériques (Shiga-Kruse).

2° Le fait qu'on peut isoler dans un filtrat dysentérique différentes fractions par la méthode de l'adsorption spécifique, confirme l'exactitude de cette hypothèse.

3° L'hypothèse que nous avons adoptée de la structure des filtrats dysentériques, explique les modifications régulières



qu'on y observe : augmentation de la toxicité, de la stabilité et du pouvoir immunisant.

4° La structure complexe des antigènes dysentériques et la valeur inégale au point de vue du pouvoir immunisant de ses fractions met en doute la possibilité d'évaluer la qualité d'un antigène par une unité antigénique unique.

5° Les résultats obtenus dans l'étude des filtrats dysentériques et les données prémonitoires observées dans la floculation des toxines diphtériques, permettent d'étendre l'hypothèse émise sur la structure des filtrats dysentériques aux filtrats bactériens en général.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*